

**PRODUCTION D'ACIDE PROPIONIQUE SUR UN MILIEU  
RICHE EN EXTRAITS DE LEVURE**

**par**

**NANCY GARDNER**

**mémoire présenté au Département de Biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc)**

**FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

**St-Hyacinthe, Québec, Canada, août 1998**



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-40583-4

Le 2/août 1998

le jury suivant a accepté ce mémoire, dans sa version finale.

Président-rapporteur:

Mme Carole Beaulieu  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

Membre:

M. Claude Déry  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

Membre:

M. Ryszard Brzezinski  
Département de biologie

\_\_\_\_\_

Membre:

M. Claude Champagne  
Agriculture Canada

\_\_\_\_\_

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>v</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES PLANCHES .....</b>	<b>x</b>
<b><u>CHAPITRE I: INTRODUCTION</u> .....</b>	<b>1</b>
<b>1 BACTERIES PROPIONIQUES .....</b>	<b>1</b>
1.1 Caractères phénotypiques .....	1
1.2 Utilisation industrielle des propionibactéries et de l'acide propionique ..	2
1.3 Exigences nutritionnelles des propionibactéries .....	3
1.3.1 Les sources carbonées .....	3
1.3.2 Les sources azotées .....	3
1.3.3 Les facteurs de croissance .....	4
1.3.4 Les conditions de croissance .....	5
1.4 Méthodes de dénombrement .....	5
1.4.1 Le passé .....	5
1.4.2 L'avenir .....	6
<b>2 L'ACIDE PROPIONIQUE .....</b>	<b>7</b>
2.1 Métabolisme de l'acide propionique .....	7
2.2 Mode d'action des acides organiques comme agents de conservation ..	10
2.3 Production commerciale de l'acide propionique .....	12



<b>3 LES EXTRAITS DE LEVURE .....</b>	<b>13</b>
3.1 Utilisation des extraits de levure .....	13
3.2 Production des extraits de levure .....	13
<b>4 IMMOBILISATION DES BACTÉRIES .....</b>	<b>16</b>
4.1 Inclusion dans l'alginate .....	16
4.2 Relargage .....	18
4.3 Contaminations avec les cellules immobilisées .....	19
4.4 Réacteurs avec cellules immobilisées .....	20
<b>5 FERMENTATIONS PANAIRES .....</b>	<b>20</b>
5.1 L'activité de la levure .....	21
5.1.1 Les nutriments .....	21
5.1.2 La disponibilité de l'eau .....	22
5.1.3 La température de la pâte .....	22
5.1.4 Le pH de la pâte .....	22
5.2 Les ingrédients du pain .....	23
5.2.1 La farine .....	23
5.2.2 Le sel .....	23
5.2.3 Le sucre .....	23
5.2.4 Agents de conditionnement .....	24
5.2.5 La levure .....	24
5.2.6 Les huiles et les gras .....	24
5.2.7 Les agents de conservation chimiques .....	25
5.2.8 Agents de conservation "naturels" .....	27
<b>6 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....</b>	<b>28</b>
6.1 Hypothèses .....	28
6.2 Objectifs .....	28

## **CHAPITRE II:PROCÉDÉS DE FERMENTATION et PRODUCTION DES EXTRAITS**

<b><u>RICHES EN ACIDE PROPIONIQUE</u></b>	<b>29</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>29</b>
<b>2 MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>30</b>
2.1 Microorganisme	30
2.2 Milieux de culture	30
2.3 Immobilisation	31
2.4 Production des cellules libres	31
2.5 Mise au point des méthodes de dénombrement des bactéries viables	31
1. Méthode classique sur milieu solide ("pour plate")	32
2. Méthode du Petrifilm	32
3. Méthode du Live Dead BacLight	33
2.6 Analyse des métabolites	34
2.7 Fermentations	34
2.7.1 Fermentations en flacons	34
2.7.2 Fermentations en bioréacteur	35
2.8 Séchage par atomisation	35
2.9 Analyse statistique	36
<b>3 RÉSULTATS et DISCUSSION</b>	<b>38</b>
3.1 Résultats des méthodes de dénombrement	38
1. Atmosphère d'incubation	38
2. Petrifilm vs Lactate	38
3. Microscopie en fluorescence	40
4. Dénombrement lors des étapes de fabrication de billes	44
3.2 Concentration en extraits de levure	45
3.3 Fermentations successives en flacons	47
-Effet du milieu sur la croissance cellulaire	49
-Effet sur la consommation des substrats	50
-Effet du milieu sur la production des acides organiques	54

3.4 Fermentations successives en bioréacteur .....	57
-les substrats .....	57
-les produits .....	57
-la biomasse .....	59
3.5 Production des poudres .....	59
4 CONCLUSION .....	63

### **CHAPITRE III: EFFET ANTIFONGIQUE ET BIOSTIMULANT DES EXTRAITS DE LEVURE RICHES EN ACIDE PROPIONIQUE** .....

1 INTRODUCTION .....	69
2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	70
2.1 Production de suspensions de spores .....	70
2.2 Production des pains .....	70
2.3 Ensemencement des pains avec les moisissures .....	72
2.4 Effet biostimulant des extraits sur la levure .....	72
2.4.1 En panification .....	72
2.4.2 En production de biomasse .....	72
3 RÉSULTATS et DISCUSSION .....	73
3.1 Effet de l'addition des extraits sur les pains .....	74
3.2 Effet antifongique des extraits sur les pains .....	78
3.2 Effet biostimulant en panification .....	79
3.2.1 Sur le métabolisme de la levure de boulangerie .....	79
3.2.2 Sur la croissance de la levure-concentration de l'extrait ....	81
3.2.3 Discrimination entre les extraits .....	83
4 CONCLUSION .....	85

<b><u>CHAPITRE IV :CONCLUSION GÉNÉRALE</u></b> .....	88
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	92

## SOMMAIRE

L'acide propionique est un acide largement utilisé pour la conservation des aliments, spécialement dans les produits de boulangerie. L'objectif de ce travail était de le produire par voie fermentaire dans un milieu riche en extrait de levure. La bactérie responsable de cette fermentation, *Propionibacterium shermanii* pousse cependant très lentement et il est difficile de concevoir des fermentations commercialement intéressantes dans ce contexte. La technique des cellules immobilisées fut utilisée avec des populations bactériennes concentrées pour contourner le problème, ce qui a permis d'accélérer les fermentations et d'utiliser la même biomasse pour plusieurs productions.

Le milieu de fermentation était constitué d'une importante proportion d'extrait de levure (7%). Trois extraits de levure différents ont été utilisés. L'objectif principal de cette addition dans le milieu de production était d'augmenter la valeur d'utilisation de l'extrait en produisant un agent de conservation d'origine naturelle. Les concentrations initiales de substrats (lactate et glucose) ont été optimisées par rapport aux rendements en acide propionique. Les fermentations furent complétées en moins de 44 hres et des rendements en acide propionique ont atteint plus de 2 g/100 mL de milieu et ce malgré un faible taux de croissance dans la matrice d'alginate.

Une fois fermenté et séché en poudre, ce milieu de production a été utilisé comme ingrédient dans des pâtes à pain blanches. Le pouvoir antifongique a été évalué ainsi que l'effet biostimulant des extraits sur la panification.

Les extraits de levure ont eu peu d'effet sur la panification en général, les pains expérimentaux étant similaires aux pains témoins en terme de volume. Les pains contenant des extraits de levure fermentés ont été protégés plus longtemps contre les moisissures que les pains contenant des extraits non fermentés. Comparés aux témoins, les extraits fermentés ont augmenté de 1.3 jour la résistance des pains aux moisissures mais cette différence ne fut pas jugée significative. De même sur la

production de gaz dans les pâtes à pain, les extraits fermentés ont favorisé la fermentation par rapport aux extraits non fermentés alors qu'il n'y a pas eu de différence significative comparé aux témoins.

Finalement une méthode rapide de dénombrement direct pour *Propionibacterium* par microscopie en fluorescence fut développée et comparée à la méthode classique et à l'utilisation de plaques préparées commercialement (Petrifilm, 3M). Les comptes obtenus sur Petrifilm se comparant favorablement aux méthodes standard de dénombrement, cette méthode fut donc utilisée tout au long du projet.

## REMERCIEMENTS

Si le chemin menant à l'accomplissement de ce projet fut difficile par moment il fut aussi une grande source de motivations et de petites victoires. Pour cela je remercie particulièrement mon directeur, M. Claude Champagne de m'avoir permis d'exécuter mes travaux de laboratoire dans le cadre de mon travail et M. Claude Aubé d'avoir approuvé le concept.

Je remercie également M. Claude Déry, co-directeur, pour le support administratif et les tâches ingrates qu'il dû accomplir pour m'éviter de parcourir la distance St-Hyacinthe, Sherbrooke.

L'expertise et l'aide de M. Pierre Gélinas et de Mme Carole McKinnon furent grandement appréciée, merci.

Merci à Julie Fontaine pour son travail impeccable, ses judicieux conseils et sa gentillesse.

Merci à Hélène, Tony, Nicolas et Daniel pour leur aide précieuse et leur amitié.

À Marc, merci de m'avoir soutenu malgré les tourbillons.

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE I

<b>Tableau 1:</b> Pourcentage des molécules indisociées selon le pH .....	<b>12</b>
<b>Tableau 2:</b> Analyse chimique des extraits de levure commerciaux .....	<b>15</b>
<b>Tableau 3:</b> Spectre d'action des agents antimicrobiens utilisés en boulangerie .....	<b>26</b>

### CHAPITRE II

<b>Tableau 1:</b> Effet des étapes d'immobilisation et d'homogénéisation sur la viabilité de <i>Propionibacterium shermanii</i> .....	<b>44</b>
<b>Tableau 2:</b> Effet de l'alginate sur la viabilité de la souche .....	<b>45</b>
<b>Tableau 3:</b> Effet du milieu sur la biomasse et la production d'acides organiques chez <i>Propionibacterium shermanii</i> en cellules libres .....	<b>46</b>
<b>Tableau 4:</b> Rendements de poudre obtenue pour les extraits fermentés .....	<b>61</b>

### CHAPITRE III

<b>Tableau 1:</b> Bloc expérimental des fabrications de pain .....	<b>71</b>
<b>Tableau 2:</b> Effet de l'addition de l'extrait de levure sur les volumes du pain .....	<b>75</b>
<b>Tableau 3:</b> Effet antifongique des extraits sur les pains .....	<b>78</b>
<b>Tableau 4:</b> Effet des extraits sur la croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>83</b>

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

<b>Figure 1:</b> Voies métaboliques des propionibactéries .....	9
---	---

### CHAPITRE II

<b>Figure 1:</b> Relation entre la méthode du Petrifilim et la mise en plaque pour le dénombrement de <i>Propionibacterium</i> .....	39
<b>Figure 2:</b> Comparaison entre les méthodes de dénombrement pour <i>Propionibacterium</i> .....	41
<b>Figure 3:</b> Effet du milieu et de la population initiale de <i>Propionibacterium</i> dans les billes ....	48
<b>Figure 4:</b> Effet de la concentration de glucose sur la biomasse incluse dans un milieu YE 7% à 1 et 2% de lactate .....	51
<b>Figure 5:</b> Consommation du lactate dans les milieux YE à différentes concentrations de glucose .....	52
<b>Figure 6:</b> Consommation du glucose dans les milieux YE .....	53
<b>Figure 7:</b> Production d'acide acétique dans le milieu YE 7% à 1 et 2% de lactate .....	55
<b>Figure 8:</b> Production d'acide propionique dans le milieu YE 7% .....	56
<b>Figure 9:</b> Evolution des composés lors des fermentations successives avec le milieu YE 7% avec 3 extraits différents .....	58
<b>Figure 10:</b> Effet de l'extrait de levure utilisé sur la production de biomasse dans le milieu YE lors de fermentations successives .....	60
<b>Figure 11:</b> Contenu en acide acétique et propionique des poudres fermentées .....	62



### **CHAPITRE III**

<b>Figure 1:</b> Surface totale des trous selon les ingrédients utilisés .....	74
<b>Figure 2:</b> Surface moyenne des trous selon les ingrédients utilisés .....	74
<b>Figure 3:</b> Acide propionique contenu dans les pains additionnés d'extraits de levure fermentés .....	76
<b>Figure 4:</b> Ethanol contenu dans les pains additionnés d'extraits de levure .....	77
<b>Figure 5:</b> Effet de l'ajout des extraits de levure sur la production de gaz dans les pâtes à pain .....	80
<b>Figure 6:</b> Effet de la concentration d'extraits de levure sur la croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	82
<b>Figure 7:</b> Effet de la fermentation des extraits de levure sur la croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	84

### **LISTE DES PLANCHES**

### **CHAPITRE II**

<b>Planche 1:</b> Fermenteur Braun et séchoir atomiseur Büchi .....	37
<b>Planche 2:</b> <i>Propionibacterium</i> en microscopie en fluorescence .....	43
<b>Planche 3:</b> Microscopie à balayage de <i>Propionibacterium</i> immobilisé dans une matrice d'alginate .....	64

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1 LES BACTERIES PROPIONIQUES

##### 1.1 Caractères phénotypiques

Les bactéries propioniques appartiennent à la famille des *Propionibacteriaceae* du groupe des Actinomycètes. Ce sont des bactéries Gram-positive, non sporulentes, non mobiles et catalase positive. Elles sont habituellement pléomorphes présentant des formes allongées, coccoïdales et parfois montrant des embranchements selon les espèces. Elles sont capables de métaboliser divers hydrates de carbone ainsi que le pyruvate et le lactate. Elles produisent des acides organiques variés comme l'acide propionique, l'acide acétique, l'acide succinique, l'acide formique et d'autres en moindre quantité. Elles acidifient le milieu en présence de glucose et produisent du CO<sub>2</sub>. La plupart des souches croissent dans un bouillon glucose avec 20% de bile ou 6.5% de NaCl. Les colonies peuvent être blanches, roses, jaunes ou oranges. Les bactéries propioniques sont présentes dans les produits laitiers, sur la peau des humains et dans le tractus intestinal des humains et des animaux et certaines espèces sont pathogènes. Les caractères d'identification de chaque espèce sont présentés en annexe A.

Les espèces de *P. freudenreichii* sont isolées du lait cru et des fromages de type suisse. Les souches de cette espèce sont différenciées selon leur réduction du nitrate et leur capacité à fermenter le lactose. *P. shermanii* fermente aussi le maltose et le melibiose alors que *P. freudenreichii* ne les fermente pas.

## 1.2 Utilisation industrielle des propionibactéries et de l'acide propionique

Ces microorganismes ont un rôle important pour plusieurs procédés industriels. Par exemple, les propionibactéries sont responsables de la formation de la saveur et des yeux dans les fromages Emmental et type suisse (Hettinga et Reinbold, 1972). Dans ces fromages, *Propionibacterium* peut produire jusqu'à 1% d'acide propionique (Bibek et Daeschel, 1985). Les bactéries propioniques produisent en plus du CO<sub>2</sub>, du diacétyl et des acides gras volatils (Kret et Stine, 1951). Leur croissance se produit surtout lors de la maturation du fromage (18-24°C) et leur nombre atteint 10<sup>9</sup>cfu/g de fromage après 4 à 8 semaines. Leur présence peut par contre entraîner des défauts dans les fromages pour lesquels la fermentation propionique n'est pas désirable (Champagne et Lange, 1990).

L'acide propionique entre dans la composition des plastiques de cellulose, des herbicides et des parfums (Vivian et Yang, 1992). Mais c'est surtout pour son pouvoir antifongique qu'il est utilisé dans les produits de boulangerie et de pâtisserie. L'acide propionique constitue à lui seul 75% de tous les agents de conservation chimiques consommés. La demande pour ce produit est en croissance. La production annuelle dépasse 54 000 tonnes américaines et son prix varie de \$0.73 à \$0.82 le kilo (Sauer, 1993). L'acide propionique est utilisé dans divers procédés comme ingrédient alimentaire pour les arômes (Playne, 1985). Il est largement utilisé pour son pouvoir antifongique principalement dans les produits de boulangerie. Ses sels de calcium, de sodium et de potassium sont généralement reconnus comme des substances sécuritaires pour usage général dans l'industrie alimentaire. Ces bactéries sont également utilisées pour l'ensemencement de l'ensilage en alimentation animale (Flores-Galarza *et al.*, 1985).

Les propionibactéries sont également productrices de vitamine B<sub>12</sub> (Playne, 1985; Youngsmith et Apiraktivongse, 1983). Il est reconnu qu'elles ont un effet bénéfique sur la santé animale et humaine (Mantère-Ahlhonen, 1982; Skupin *et al.*, 1977). Des essais *in vitro* ont démontré que *Propionibacterium* survivait à la digestion. Même s'il n'a pas été démontré qu'il y avait adhésion ou colonisation de l'intestin chez le porcelet, la présence des propionibactéries a amené des effets

bénéfiques. Ainsi un gain de poids plus élevé et des diarrhées moins fréquentes furent observés dans les groupes ayant un régime supplémenté en propionibactéries (Mantere-Alhonen, 1995). Trois bactériocines provenant des propionibactéries ont été identifiées. De plus, le contenu minéral (Cu, Fe, Zn, Mn) des biomasses de ces bactéries pouvant contribuer à l'effet probiotique fut trouvé supérieur à celui des bactéries lactiques et des bifidobactéries (Mantere-Alhonen, 1995).

### **1.3 Exigences nutritionnelles des propionibactéries**

#### **1.3.1-Les sources carbonées**

La capacité de fermenter divers hydrates de carbone varie selon les espèces. La plupart des propionibactéries fermentent le glucose, le glycérol, le fructose et le mannose. Une stimulation de la croissance a été observée lorsque le glucose était autoclavé avec le milieu plutôt qu'ajouté aseptiquement (Field et Lichstein, 1957 et 1958). La sous-espèce de *P. shermanii* se distingue des autres *P. freudenreichii* par sa capacité à fermenter le lactose (Hettinga et Reinbold, 1972a). Il a été démontré qu'un milieu contenant 1% de lactate de sodium stimulait davantage la production d'acide propionique qu'un milieu contenant 1% de lactose chez *P. shermanii* (El-Hagarawy, *et al.* 1954). La même chose a été observée avec *P. acidilactici*. Cependant, cinq fois plus de cellules furent obtenues sur un milieu contenant du lactose comparé à un milieu contenant du lactate. La croissance cellulaire est aussi moins importante sur glucose que sur lactose (Lewis et Yang, 1992). Malgré le fait que la croissance soit plus lente sur lactate que sur lactose ou glucose, les temps de fermentation ne sont que légèrement plus longs pour le lactate à pH 6.6. Etant donné que moins de cellules sont produites sur ce substrat, cela implique qu'une cellule fermente le lactate avec un meilleur rendement en métabolites que sur lactose. Il a été démontré que la consommation spécifique de lactate était d'environ 0.3 g/L à l'heure alors qu'il se situait autour de 0.15 g/L à l'heure pour le lactose pour les mêmes biomasses.

### 1.3.2 -Les sources azotées

La présence des extraits de levure stimule la fermentation du lactate. La biotine, la thiamine, l'acide panthoténique et l'acide para-aminobenzoïque n'ont pas amélioré la croissance lorsque des extraits de levure furent ajoutés au milieu. Il a été démontré depuis longtemps que les propionibactéries contiennent les peptidases nécessaires pour obtenir les acides aminés essentiels à leur croissance (Berger *et al.*, 1938). Selon Tatum *et al.* (1936) les acides aspartique et glutamique peuvent remplacer le nitrate d'ammonium comme facteur de croissance. Les mêmes auteurs ont démontré que les propionibactéries peuvent utiliser l'azote ammoniacal. Quesada-Chanto *et al.* (1994) ont tenté de déterminer le facteur ou les groupes de facteurs biostimulants pour les propionibactéries contenus dans les extraits de levures mais sans succès. Ils ont cependant remarqué des différences selon les extraits commercialement disponibles. Les rendements plus élevés en acide propionique furent observés avec un extrait commercial Difco (Détroit, Mich., USA) comparativement à une dizaine d'autres extraits. Une concentration de 12 g/L est optimale pour la croissance cellulaire et la formation d'acide propionique.

### 1.3.3-Les facteurs de croissance

La présence du cobalt est essentielle pour la croissance des Propionibactéries. Une concentration de 5 mg/L optimise la formation d'acide propionique et la production de biomasse (Quesada-Chanto *et al.*, 1994). L'acide pantothénique et la biotine sont des facteurs de croissance utiles aux propionibactéries. *Propionibacterium freudenreichii* utilise plutôt la coenzyme A (CoA) à la place de l'acide pantothénique (Moat *et al.*, 1950). La riboflavine stimule la croissance de ces bactéries mais n'est pas un constituant essentiel du milieu (Wood *et al.*, 1938).

Le fer et ses ions stimulent la production d'acide propionique. Le magnésium et le manganèse accélèrent la décarboxylation du succinate et ces éléments avec le cobalt sont des cofacteurs nécessaires dans diverses réactions enzymatiques lors de la formation du propionate (Quastel, 1938; Sathyanarayana *et al.*, 1964)

#### 1.3.4- Les conditions de croissance

Certaines souches tolèrent des tensions réduites d'oxygène, d'autres ne poussent qu'en conditions strictes anaérobies. Il a été démontré que pour augmenter les rendements en acide propionique des conditions anaérobies étaient nécessaires (Quesada-Chanto *et al.*, 1994). La température de croissance des propionibactéries se situe autour 30-37°C. La température optimale de production d'acide propionique est de 37°C alors que pour la production de la vitamine B<sub>12</sub>, elle se situe à 40°C.

Dans un milieu à base de lactose, le pH optimum de *P. acidipropionici* se situe entre 6.1 et 6.8 montrant une croissance spécifique de 0.23 h<sup>-1</sup> (Sheng-Tsiung et Shang-Tian, 1991). Les propionibactéries sont très sensibles au pH, il y a peu de croissance lorsque le pH se situe en bas de 5.0 (Marcoux *et al.*, 1992). En conditions acides, les fermentations étaient beaucoup plus lentes mais les rendements en acide propionique furent plus élevés. Il a été noté qu'une quantité supérieure de nutriments était nécessaire pour assurer une production efficace d'acide propionique en conditions acides.

Les cellules peuvent croître à des pH beaucoup plus acides en présence de lactose qu'avec du lactate comme source de carbone (Lewis et Yang, 1992).

### 1.4 Méthodes de dénombrement

#### 1.4.1- Le passé

Les méthodes conventionnelles de mise en plaque convenaient mal au dénombrement des propionibactéries. Des méthodes variées ont été utilisées dans le passé pour favoriser la croissance de ces bactéries.

Von Freudenreich et Orla-Jensen (1906), qui furent les premiers à isoler ces microorganismes,

utilisèrent des tubes scellés contenant un milieu solide et obtinrent ainsi des conditions anaérobies. Plus tard, du sulfite de sodium fut ajouté comme agent réducteur dans le milieu de culture. Une double-couche de milieu et de paraffine stérile était ajoutée pour recouvrir la cultureensemencée et ainsi diminuer la tension d'oxygène.

Une technique plus simple de mise en plaque toujours avec double-couche et l'incorporation de thioglycollate de sodium comme agent réducteur fut développée. Finalement Vedamutha et Reinbold (1967) recommandèrent l'utilisation de la jarre chandelle et d'un milieu à base de lactate de sodium sans double-couche, cette méthode nécessitant 7 jours d'incubation à la température de la pièce et 5 jours à 32°C. Certaines espèces exigent cependant des conditions anaérobies strictes. De plus, la combustion d'une chandelle dans un environnement peut potentiellement, outre le CO<sub>2</sub>, générer des gaz inhibiteurs. La mise au point de systèmes réducteurs d'oxygène et générateurs de CO<sub>2</sub> a permis de produire des conditions anaérobies contrôlées.

#### 1.4.2- L'avenir

L'apparition récente de plaques commerciales préparées (Petrifilm) offre une méthode potentielle de dénombrement plus simple et peut-être plus efficace. De même, le développement de systèmes de coloration vitale pour observation microscopique en fluorescence constitue une méthode prometteuse pour notre application spécifique car les microorganismes sont dénombrés de façon directe sans devoir être en conditions de croissance.

La méthode du DEFT (direct epifluorescence filter technique) fut suggérée par Pettipher (1990) pour l'observation des échantillons de lait. Cette méthode implique un prétraitement de l'échantillon suivi d'une filtration et de la coloration avec l'acridine orange. La méthode de différenciation repose sur le fait que l'ARN fluoresce orange alors que l'ADN fluoresce vert. En principe, le rapport ARN/ADN est plus élevé dans les microorganismes en croissance et ceux-ci devraient donc apparaître oranges. Cependant bien d'autres facteurs sont impliqués dans la coloration des microorganismes rendant cette différenciation vitale plus ou moins évidente.

## 2 L'ACIDE PROPIONIQUE

### 2.1 Métabolisme de l'acide propionique

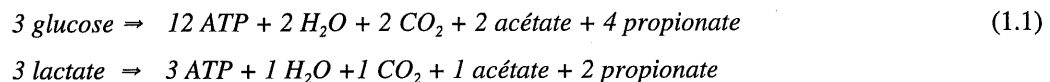
Plusieurs voies de dégradation des hydrates de carbone vers le propionate ont été décrites pour les propionibactéries. Les sucres sont principalement dégradés via les voies d'Embden-Meyerhof et de l'hexose monophosphate (HMP). Le lactate est transformé en pyruvate à l'aide de la lactate déshydrogénase (figure 1, 1 et 11). Crow (1986) a démontré que *P. shermanii* utilise principalement l'isomère L-(+) du lactate. Le temps de dédoublement de cette souche poussant sur L-(+)-lactate est d'environ 4.5h comparé à 8h sur D-(-)-lactate. Pendant la fermentation du lactate, le pyruvate se retrouve dans le milieu de croissance jusqu'à la disparition du substrat. Ensuite, le pyruvate disparaît complètement à son tour. Par contre, lorsque le glucose ou le lactose furent utilisés comme substrat, le pyruvate ne fut pas détecté. Crow (1986) a également démontré que le pyruvate inhibait l'activité de la D-(-)-lactate désydratase expliquant la préférence de *Propionibacterium* pour la forme L-(+). La plupart des souches de propionibactéries utilisent préférentiellement le lactate au glucose.

L'acide propionique n'est pas un produit de fermentation unique, étant habituellement accompagné par la production d'acide acétique et de CO<sub>2</sub>. Cette production est présente pour des raisons de bilan rédox. Un rapport de propionate/acétate de 2:1 est généralement observé, ce ratio pouvant grimper à 5:1 selon les conditions de croissance (Hettinga et Reinbold, 1972). Cette proportion est contrôlée par la thermodynamique lors de la gestion de l'ATP et la génération d'entropie (Playne, 1986). Il est maintenant évident que la formation de l'acide propionique implique deux cycles dont l'un inclut l'isomérase et une transcarboxylase du méthylmalonyl. L'autre est un cycle CoA impliquant une transférase du propionyl-CoA. Les réactions sont résumées dans la figure 1. L'oxaloacétate provient de deux réactions: une par la fixation du CO<sub>2</sub> sur le phosphoénolpyruvate et l'autre par la réaction de la transcarboxylase sur le méthylmalonyl-CoA. La transformation du phosphoénolpyruvate (PEP) en oxaloacétate favorise la production du succinate au détriment de l'acide propionique, parce que la PEP carboxylase ne fait pas intervenir le complexe biotine-CO<sub>2</sub>.



La biotine est essentielle à la décarboxylation de l'acide succinique par les propionibactéries. Elle était associée à la fixation et à la transcarboxylation du  $\text{CO}_2$ . Il a été démontré que la biotine présente dans le substrat peut agir comme un accepteur de  $\text{CO}_2$  dans une réaction catalysée par la carboxylase (Hettinga et Reinbold, 1972). Cooper *et al.* (1968) ont trouvé que la carboxylase du pyruvate était le seul enzyme dépendant de la biotine. Cette carboxylase est unique car elle ne requiert pas l'addition d'un ion métallique pour être active. Northrop et Wood (1969) ont démontré que l'ion métallique (le cobalt) et la biotine sont maintenus dans l'enzyme par des liens covalents et que la biotine remplit une fonction catalytique comme un transporteur de carboxyle. En d'autres termes, cet enzyme aidera au transfert du groupe carboxyle du méthylmalonyl-CoA au pyruvate donnant comme produit du propionyl-CoA et de l'oxaloacétate. La molécule d'oxaloacétate ainsi obtenue (grâce à la biotine) est réduite en succinate via le malate et le fumarate. Le succinate est ensuite converti en succinyl-CoA en réagissant avec le propionyl-CoA produisant de ce fait le propionate. Durant ces séquences, la CoA est régénérée de même que le méthylmalonyl-CoA permettant de réduire la dépense énergétique. Il a été démontré que les réactions de décarboxylation du succinate en propionate sont totalement réversibles (Rosner et Schink, 1990).

Douze moles et 3 moles d'ATP sont produites par 3 moles de glucose et de lactate fermentés respectivement. Le ratio des produits propionate, acétate et  $\text{CO}_2$  varie selon le pH du substrat, la concentration de lactate, de glucides et de succinate (Reinbold, 1985). Théoriquement, une mole de glucose donnera 4/3 mole de propionate et 2/3 mole d'acétate avec un rendement maximal de 54.8%. Une mole de lactate donnera 2/3 mole de propionate et 1/3 mole d'acétate avec le même rendement maximal que pour le glucose. La somme de la réaction est la suivante:



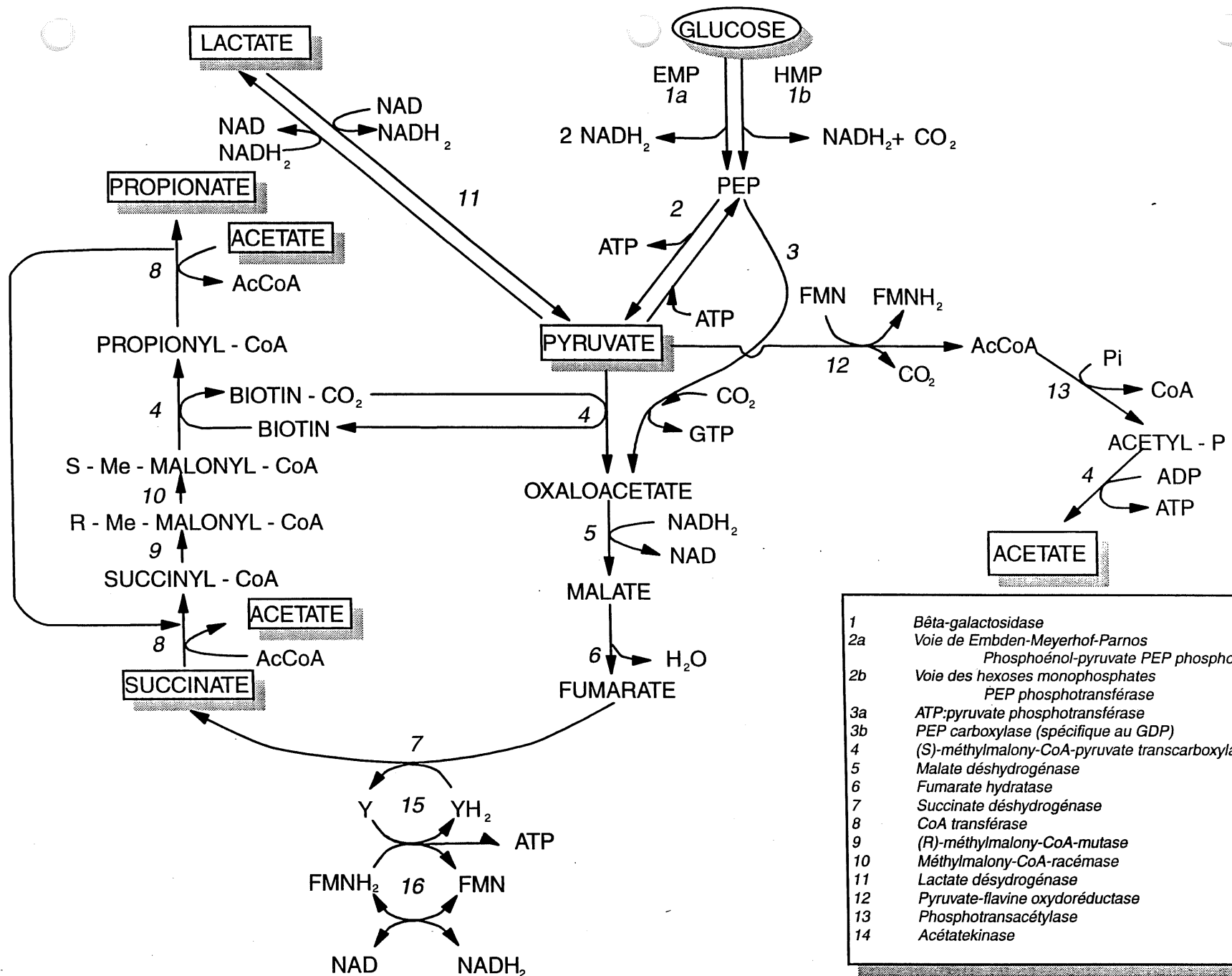


Figure 1. Voies métaboliques des propionibactéries

## 2.2 Mode d'action des acides organiques comme agents de conservation

Il est reconnu depuis longtemps que les acides organiques ont un potentiel comme agent de conservation d'aliments. Dans le cas des acides lactique et acétique, l'effet inhibiteur est principalement dû à l'abaissement du pH. Ces acides vont aussi chélater les ions métalliques et ainsi limiter la croissance bactérienne (Furia, 1968). L'acide propionique diminue de façon sensible la production des mycotoxines car il inhibe le métabolisme des champignons (Tong et Drauhon, 1985). Il est cependant peu efficace pour contrer la croissance des levures. Certaines espèces de salmonelles et de staphylocoques sont inhibées par ces acides seuls ou en mélange (Adams et Hall, 1988; Muldler *et al.*, 1987). Chez *Listeria monocytogenes* il a été démontré que l'acide acétique possède la plus grande activité antilistériale comparé aux acides lactique et citrique. Un mélange des acides lactique, acétique et propionique agit en synergie sur l'inhibition de *L. monocytogenes* ainsi que sur d'autres bactéries et les moisissures. Des études proposent même d'utiliser ce mélange obtenu par fermentation et séché comme agent de conservation naturel dans les fromages à pâte pressée (Hervé *et al.*, 1992).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Krebs a démontré que l'acide benzoïque inhibait le transport actif du glucose à l'intérieur de la cellule (Krebs, 1983). Pour *Listeria*, le transport du glucose à travers la membrane ne fut pas affecté par la présence de 5% de propionate de sodium (Kouassi et Shelef, 1996). Les acides propionique et acétique ont inhibé la synthèse de l'ATP à partir du glucose probablement dû à une inhibition d'enzymes du cycle de l'acide citrique.

Pour croître et survivre, les microorganismes maintiennent un pH interne constant. Pour les acidophiles et les neutrophiles, ce qui inclut la plupart des contaminants des aliments, le pH interne varie de 6.5 à 8.0. En général, le pH est réglé de façon à ce que la réduction de 1 unité pH à l'extérieur résulte en la réduction du pH interne de 0.1 unité ou moins. Les microorganismes maintiennent un gradient de pH transmembranaire de 0.5 à 1.0 unité pH avec des conditions intracellulaires alcalines par rapport à l'environnement. Ce gradient est vital pour le transport des

protons, des nutriments et pour la génération d'énergie nécessaire à la croissance.

On propose deux modes d'action antimicrobienne de l'acide propionique soit l'effet des protons et l'effet des molécules indissociées. Il est bon de noter que ces modes d'action s'appliquent également aux autres acides organiques tels l'acide lactique et acétique.

Premièrement, quand un acide organique comme l'acide propionique est produit dans un environnement, certaines des molécules se dissocient en ion  $H^+$  alors que d'autres demeurent indissociées. Une concentration élevée de protons à l'extérieur de la cellule expose la paroi cellulaire, les membranes et le cytoplasme aux effets détritiaux d'un pH acide. On assiste à une dénaturation des protéines et à des changements au niveau de la perméabilité des membranes qui inhibent la croissance, ce qui compromet la viabilité.

L'effet antimicrobien de l'acide propionique est cependant principalement le résultat des molécules indissociées. Des trois principaux acides organiques rencontrés, c'est l'acide propionique qui se dissocie le moins en pH acide (tableau 1).

La double paroi lipidique des microorganismes est perméable à l'acide propionique car celui-ci est lipophile facilitant sa diffusion dans le cytoplasme. Cet acide est très soluble en milieu aqueux, les molécules indissociées se dissocieront produisant anions et protons dans le cytoplasme. Pour tamponner la réduction de pH ainsi causée, la cellule neutralisera les protons. Mais lorsque la quantité de protons produits excède le pouvoir tampon de la cellule, les protons sont pompés dehors jusqu'à l'épuisement des réserves énergétiques. Les protons commencent à s'accumuler abaissant le pH interne et dénaturant les protéines et compromettant les transports actifs des nutriments et finalement inhibant la croissance cellulaire.

Tableau 1. Pourcentage des molécules indissociées pour trois acides organiques selon le pH.

Acides organiques	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0
Acide acétique	84	35	5	0.5
Acide lactique	39	6	1	0.1
Acide propionique	88	42	7	0.7

Le pH externe a un effet indirect sur la croissance et le métabolisme cellulaire mais le pH interne joue un rôle primordial dans la régulation de nombreuses activités métaboliques tels le maintien des gradients ioniques, le transport des solutés, la synthèse de l'ATP, etc. (Hutkins et Nannen, 1993).

### 2.3 Production commerciale de l'acide propionique

Dès les années 1930, la production d'acide propionique par fermentation est brevetée. Ces brevets décrivent principalement les façons d'accélérer les fermentations et d'en réduire les coûts en utilisant des substrats peu coûteux. Les fermentations sont accélérées en augmentant la biomasse de départ en introduisant des supports inertes et poreux pour retenir les cellules. Il a été proposé de démarrer les fermentations en deux étapes consistant en la production d'acide lactique par *Lactobacillus* suivie de la production d'acide propionique. Plus tard, des procédés furent développés pour utiliser les déchets de l'industrie du papier. Des fermentations en alimentation continue furent développées. A l'heure actuelle, l'acide propionique est produit par voie pétrochimique. En 1987, Union Carbide, Eastman et Celanese étaient les principaux producteurs d'acide propionique produisant 107 000 tonnes d'acide propionique par an. En 1982, aux Etats-Unis, il se vendait à \$0.73kg<sup>-1</sup>. Les utilisations principales sont sous forme de propionate de calcium ou de sodium comme agent de conservation dans le pain et autres produits alimentaires (28%), agent de conservation dans les grains (27%), cellulose plastique (20%), herbicides (20%), parfums et autres secteurs (5%).

### **3 LES EXTRAITS DE LEVURE**

#### **3.1 Utilisation des extraits de levure**

Plusieurs microorganismes poussent mieux dans un milieu contenant une fraction protéique partiellement dégradée. En fait, les hydrolysats de protéines sont devenus les premières préparations commerciales pour les milieux de culture. Une gamme variée de peptones et d'extraits est maintenant disponible reflétant bien les besoins particuliers de divers microorganismes. On trouve des hydrolysats de protéines provenant de la viande, la caséine, la lactalbumine, le lait, la gélatine, le soya et la levure.

Les extraits de levure proviennent des autolysats de levure dont les résidus insolubles ont été enlevés mécaniquement. Les autolysats et extraits de levures peuvent être utilisés comme ingrédients alimentaires et milieux de fermentation. Contenant du glutamate et des nucléotides, ils servent de rehausseurs de saveur dans les viandes, les sauces, les produits de boulangerie et les condiments. Ils contiennent généralement peu de sels et sont nutritifs. Cette source économique de peptides, d'acides aminés et de vitamines sert d'additif aux formules pour bébés, aux aliments santé et pour la production de microorganismes. Le tableau 2 montre la composition chimique des extraits de levure commerciaux.

#### **3.2 Production des extraits de levure**

Les biomasses utilisées proviennent principalement des brasseries et ensuite des levures de boulangerie produites sur mélasse (*Saccharomyces cerevisiae*). Ces cellules sont sous forme aqueuse, comprimée ou granulée mais on utilise plus couramment la levure en crème (Peppler, 1982).

L'autolyse ou l'autodigestion sert à solubiliser les constituants intracellulaires d'intérêts de la levure. La réaction débute avec une augmentation de la température autour de 55-60°C pendant 48 heures

à un pH de 5.5-5.7 (Ryan et Ward, 1985) permettant de fermenter les sucres de réserves de la levure (principalement le glycogène). L'activité des enzymes endogènes augmente et l'action des protéases et des nucléases, agissant sur la membrane et la paroi cellulaire, diminue la sélectivité de la cellule. Ceci entraîne la fuite vers l'extérieur des constituants intracellulaires. L'extraction n'est jamais complète car les parois cellulaires, comptant pour environ 20% de la levure (base solide, p/p), retiennent des composés tels le glycogène et une partie du matériel azoté demeure insoluble. Le degré d'extraction dépend de la température, du pH, du type de levure. L'autolyse peut être accélérée avec des agents qui causeront une plasmolyse comme le chlorure de sodium, le sucrose, l'éthanol, l'acétate d'éthyl et des mélanges de sels et de solvants variés (Ryan et Ward, 1985; Sugimoto, 1974; Rooij et Hakkaart, 1986).

Les bases et acides forts sont utilisés pour améliorer la dégradation des protéines. Cette façon de faire entraîne des pertes de certains acides aminés moins stables tels le tryptophane ainsi que certaines vitamines. Des réactions de Maillard entre les glucides et les acides aminés lors de ces hydrolyses sont souvent toxiques pour la croissance des microorganismes.

Les enzymes protéolytiques agissent sur les protéines de façon moins drastiques. Ils travaillent à des températures moyennes et sont spécifiques pour certains liens peptidiques. Les protéines ne sont donc pas complètement hydrolysées en acides aminés mais en polypeptides de longueur variée. Par exemple, la pepsine coupera la chaîne où il y a un lien phénylalanine ou leucine (Dixon et Webb, 1979). Des glucanases et des nucléases peuvent être ajoutées pour accroître le degré d'extraction des cellules levuriennes

**Tableau 2.** Analyse chimique d'extraits de levure commerciaux

<b>Composés (% p/p)</b>	
Glucides	6.2-27.3
Protéines	50.8-71.7
Lipides	0.1-0.5
Cendres	9.3-25.8
Acides organiques	1.6-4.8
Acides aminés totaux	42.5-64.8
Acides nucléiques totaux	4.6-5.3
<b>Vitamines (µg/g)</b>	
Thiamine	10-50
Riboflavine	15-75
Nicotinamide	125-550
Pantothénate de calcium	30-120
Pyridoxine	1-25
Biotine	0.05-2

Tiré de Peppler, 1982



## 4 IMMOBILISATION DES BACTÉRIES

Les fermentations conventionnelles d'acide propionique ne sont pas économiquement compétitives avec la production par voie pétrochimique à cause de la durée de la fermentation et des rendements peu élevés en produits. Cependant l'intérêt pour produire les acides propionique et acétique par fermentation sur des substrats peu coûteux est grandissant (Lewis et Yang, 1992). Une fermentation propionique typique en cuve nécessite environ 3 jours pour obtenir 2% (p/vol) d'acide propionique montrant un rendement de moins de 60% (Hsu et Yang, 1991). On tente actuellement de mettre au point des souches plus performantes par le biais de souches mutantes et recombinées génétiquement (Woskow et Glatz, 1991). Malgré les résultats encourageants de cette approche, le procédé de fermentation a avantage à s'améliorer. La productivité du réacteur peut être améliorée par l'utilisation des cellules immobilisées tel que démontré par Champagne *et al.* (1989).

L'immobilisation consiste à retenir physiquement les cellules sur un support solide tout en maintenant leurs propriétés métaboliques. Elles peuvent donc être utilisées de façon répétée. Ainsi la biomasse n'a pas à être préparée pour chaque fermentation, les cellules sont plus stables et la séparation des cellules du produit en est facilitée. De plus il semble que les systèmes à bactéries immobilisées soient plus résistantes aux contaminations levuriennes ou phagiques (Champagne *et al.* 1989; Prévost et Diviès, 1988).

### 4.1 Inclusion dans l'alginate

Trois méthodes principales peuvent être utilisées pour immobiliser les bactéries:

- l'attachement à un support: adsorption à une membrane, une matrice
- la formation d'un réseau intercellulaire: les levures floculentes, les grains de kéfir
- l'inclusion: emprisonnement dans une matrice solide, un gel (Scott, 1987).

L'inclusion dans l'alginate de sodium est une des technique la plus étudiée. L'alginate est un polysaccharide constitué d'acide manuronique et d'acide glucuronique provenant des algues brunes

géantes (*Macrocystis pyrifera* ou *Laminaria digitata*). C'est un composé hydrophile, dont les sels sont retrouvés en grande proportion dans les parois cellulaires. Il est accepté pour les applications alimentaires (Diviès *et al.*, 1989).

L'inclusion consiste à emprisonner la biomasse dans un réseau rigide permettant la diffusion des nutriments et des produits. Cette technique permet d'utiliser de fortes populations microbiennes ayant un haut taux de viabilité. La suspension cellulaire concentrée par centrifugation est mélangée à l'alginate de sodium (de 1 à 2% comme concentration finale) et versée goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium. Une gélification s'ensuivra du aux interactions ioniques du cation avec les groupements carboxyliques du polysaccharide. L'alginate présente une bonne force mécanique et les billes d'alginate sont ainsi résistantes à la compression (Prévost et Diviès, 1988; Cheetam *et al.*, 1979).

Il faut cependant mentionner que l'immobilisation limite les transferts de masse, affectant principalement la diffusion des nutriments vers les cellules et limitant la disponibilité de l'oxygène à la biomasse. La limitation de l'oxygène peut possiblement être bénéfique pour certains types de procédés tel celui de la fermentation de l'acide propionique. Le taux de diffusion est aussi influencé par la nature du gel utilisé, sa concentration et la grosseur des billes d'alginate. Cette influence agit sur la diffusion des produits vers l'extérieur de la bille. Dans les fermentations alcooliques avec les levures, la concentration d'éthanol est plus élevée à l'intérieur de la sphère (Diviès *et al.*, 1994). Avec des billes plus petites dans des fermentations lactiques, l'inhibition due aux produits fut moins prononcée qu'avec des billes plus grosses (Yabannavar et Wang, 1991). Les biomasses immobilisées peuvent varier dans la densité cellulaire atteinte, la stabilité et sa résistance tout au long des réactions fermentaires selon l'état de la culture proprement dite.

Tout de suite après l'immobilisation, les bactéries sont réparties uniformément dans le gel. Cependant à la surface, les transferts de masse sont plus importants, encourageant une population de surface à se développer. Le centre de la bille devient pratiquement un volume mort. Cachon (1993) a démontré que 95% de la biomasse incluse est localisée dans une couche de 125  $\mu\text{m}$

d'épaisseur près de la surface. Cette population représente une concentration de 20 à 30 fois plus élevée qu'au centre de la bille. Notons toutefois que ces essais furent exécutés avec des bactéries lactiques qui ont un taux de croissance nettement plus élevé que *Propionibacterium*. Le gradient de substrats et de métabolites entre le centre et la périphérie est possiblement accentué dans le cas des bactéries lactiques par rapport aux propionibactéries qui démontrent un taux de croissance plus modeste. Quoi qu'il en soit, la grosseur des billes influencera la distribution de la population de façon plus ou moins importante. De fait, plus la bille sera petite et mieux seront distribuées les cellules à l'intérieur (Champagne *et al.*, 1994). Il faut cependant choisir un diamètre offrant une résistance mécanique adéquate et assez important pour permettre une séparation facile du milieu de fermentation.

#### 4.2 Relargage

Etant donné que des microcolonies se forment à la surface de la bille, certaines cellules sont relarguées dans le milieu. Au niveau de la surface des billes, à l'observation microscopique, des fissures du gel sont visibles laissant s'échapper les cellules par les pores (Champagne *et al.*, 1994). Certaines applications bénéficient de ce phénomène comme l'ensemencement en continu du lait pour la production de yaourt (Prévost et Diviès, 1988) ou la production d'acides organiques (Cavin *et al.*, 1985; Lewis et Yang, 1992).

Mis à part les caractères morphologiques des souches utilisées, un effet de l'âge de l'inoculum et de sa quantité a été observé sur le degré de relargage des cellules (Barbotin *et al.* 1990). La structure macromoléculaire du gel de support a aussi un effet sur le degré de relargage des cellules. La structure du gel d'alginate à son tour est influencée par le temps de gélification, la concentration du cation, la viscosité, la température, le pH et le rapport d'acide guluronique/mannuronique de l'alginate (Nava Saucedo *et al.*, 1994). Par exemple, plus la concentration du calcium est élevée, plus il y aura de canaux dans la structure de la bille, favorisant le relargage.

### 4.3 Contaminations avec les cellules immobilisées

Il semble que les bactéries immobilisées soient moins susceptibles d'être contaminées qu'en cellules libres en raison de la rapidité de la fermentation avec les cellules incluses (Kennedy et Cabral, 1983). Pour une biomasse destinée à des fermentations répétitives ou de longue durée, il est essentiel d'en connaître la résistance à la contamination. Champagne *et al.* (1989) ont démontré qu'en fermentations successives en vrac, les levures ne réussissaient pas à s'implanter comme contaminants dans un système de *Lactococcus lactis* immobilisés. Un taux de croissance des contaminants bas et le rinçage des billes entre chaque fermentation empêchaient une telle implantation. Dans un système en continu, une implantation serait d'autant plus difficile avec un taux de dilution élevé. Il est possible d'opérer à de haut taux de dilution sans danger de lessivage du ferment grâce à la technologie des cellules immobilisées.

Malheureusement, l'immobilisation des bactéries ne les protège pas toutes contre les attaques phagiques (Champagne *et al.*, 1988). Il semble que les cellules relarguées dans le milieu soient d'emblée attaquées par les phages. Lorsque des cellules de *Lactococcus lactis* immobilisées furent exposées à des phages, l'acidification n'était pas affectée, indiquant que les cellules incluses étaient protégées de la lyse (Stenson *et al.*, 1987). Il semble que les phages soient exclus des billes à cause de leur taille supérieure à celle des pores d'alginate (Klein *et al.*, 1983). En plus, la croissance des cellules immobilisées est ralentie dans les billes ce qui freine le cycle du phage qui a besoin d'une cellule active pour se multiplier. On retrouve cependant des cellules en croissance active à la surface des billes et elles sont probablement susceptibles d'être infectées.

Jusqu'à tout récemment, seuls des phages contre *Propionibacterium acnes*, une espèce cutanée avaient été décrits dans la littérature. Cependant, des bactériophages attaquant *P. freudenreichii* ont été isolés de fromages suisses (Gauthier *et al.*, 1995). Les phages proviennent principalement du lait ce qui n'exclut pas la possibilité qu'ils soient contenus dans le ferment sous forme de prophage. Malgré le fait que des phages se retrouvent en quantité importante dans le fromage suisse, leur impact sur la production est probablement minime dû au milieu solide dans lequel ils sont contenus,

limitant leur propagation.

#### **4.4 Réacteurs avec cellules immobilisées**

Il a été démontré que *Propionibacterium* immobilisé augmentait la performance du réacteur par rapport aux cellules libres. Cavin *et al.* (1985) ont immobilisé une souche commerciale dans l'alginat pour produire des arômes de fromage suisse et de l'acide propionique en continu. Les cellules immobilisées offrent l'avantage d'opérer en continu sans risque de lessivage des cellules même à des hauts taux de dilution. Pendant la fermentation, le nombre de cellules contenues dans les billes a augmenté d'une unité log et le système a atteint la stabilité au bout de 60 heures. Le bioréacteur fut maintenu dans les mêmes conditions pour une période de 2 mois sans que les particules ou que les cellules ne montrent des signes de défaillance. En 30 minutes dans le fermenteur, une plus grande quantité d'acides volatils fut produite qu'en 96 heures en fermentation unique.

Lewis et Yang (1992) ont proposé un bioréacteur dans lequel les cellules de *Propionibacterium* sont adsorbées sur une fibre spiralée présentant une large surface. Ce bioréacteur montra une productivité de 3 à 4 fois plus grande qu'une fermentation conventionnelle. Le système a pu être opéré pour plusieurs mois sans perte de productivité, sans problème de colmatage, de dégénération ou de contamination si souvent rencontrés avec les autres types de réacteurs. Les auteurs ont remarqué que les cellules immobilisées de *Propionibacterium* produisaient plus d'acide acétique que les cellules libres. De par sa nature, ce bioréacteur offre l'avantage de pouvoir renouveler la biomasse car celle-ci s'attache naturellement aux fibres. Ce caractère est essentiel à une opération de longue durée générant des cellules inactives.

### **5 FERMENTATIONS PANAIRES**

Des fermentations panaires ont été effectuées afin d'évaluer une application commerciale potentielle des extraits de levure fermentés par *Propionibacterium*. Ces extraits riches en acide propionique

pourront servir d'agent antifongique dans le pain.

L'objectif de la fermentation panair par la levure est de faire "monter" le pain et de lui léguer de la saveur. La levure doit être apte à assimiler les hydrates de carbone disponibles et les convertir en  $\text{CO}_2$  et alcool. Pendant cette phase initiale de la fermentation, des sous-produits sont formés contribuant à la saveur et au conditionnement du gluten. Des enzymes peuvent être ajoutés pour rendre l'amidon plus facilement assimilable à la levure.

Les levures utilisées en boulangerie sont principalement des *Saccharomyces cerevisiae* sélectionnées pour leur aptitude à former du gaz rapidement et pour leur capacité à assimiler les sucres de maltose. Le nombre de cellules de levure n'augmente pas pendant la levée car les levures ne se divisent pas dans l'environnement anaérobie de la fermentation. La levure contribue ensuite à la maturation de la pâte. Le pH acidifié apporté par la levure et l'éthanol auront des effets sur le développement de la pâte.

L'activité de la levure dans une pâte à pain dépend de 4 facteurs soit, les nutriments, la disponibilité de l'eau, la température et le pH.

## **5.1 L'activité de la levure**

### **5.1.1- Les nutriments**

Les sucres simples tels le glucose et fructose sont facilement assimilables par la levure. La levure devra assimiler tous ces autres sucres avant de produire la maltase hydrolysant à son tour le maltose issu de l'amidon. Le sucrose ne peut pénétrer la levure avant d'être hydrolysé en glucose et fructose par l'invertase produite par la levure.

La farine fournit environ 1 % des sucres à la levure. A cette concentration, ce n'est généralement pas suffisant pour produire un pain pleinement développé. Il existe deux façons d'augmenter l'apport

glucidique soit en ajoutant directement des sucres à la formulation ou en ajoutant des amylases agissant sur l'amidon de la farine pour produire du maltose. La levure a une activité maximale lorsqu'en présence de 4-6% (base poids farine) de sucre. A des concentrations supérieures, la pression osmotique diminue le métabolisme. En Amérique, généralement on fermente avec 8-10% de sucre en compensant la perte d'activité par une concentration plus élevée de cellules (Reed, 1972).

#### 5.1.2-La disponibilité de l'eau

Dans une pâte contenant moins d'eau comme dans les pains de spécialité ou les brioches, la fermentation sera plus lente. De même dans une pâte plus humide, parce qu'ils sont dilués, les nutriments solubles dans l'eau exerceront une pression osmotique moins élevée favorisant l'activité de la levure.

#### 5.1.3-La température de la pâte

La température est le principal facteur contrôlé par le boulanger pour gérer la fermentation. Selon les types de pains, on utilise des températures variant de 25 à 37°C. Une augmentation de 0.55°C de la pâte augmente la production de gaz de la levure de 4%. Pendant la fermentation panitaire, de la chaleur est générée, favorisant l'activité de la levure.

#### 5.1.4-Le pH de la pâte

L'activité de la levure est favorisée par un pH acide. Généralement, le pH des pâtes à pain se situe entre 4 et 6. Lors de la panification il y aura production de CO<sub>2</sub> et d'acides diminuant le pH et favorisant cette activité.

## 5.2 Les ingrédients du pain

### 5.2.1-La farine

La fonction principale de la farine dans le pain est de fournir les protéines et l'amidon qui influencent l'élasticité et la force de la pâte. La farine contient entre 10 et 13% de protéines. Le gluten est composé principalement de la glutenin et de la gliadin. Ces protéines s'hydratent avec l'ajout de l'eau et le malaxage. Il est reconnu que ces deux protéines ont un rôle important au niveau de l'élasticité de la pâte. C'est grâce à la structure du gluten que le gaz produit pendant la fermentation sera retenu.

La farine est constituée de 67 à 70% d'amidon. L'amidon du blé est composé de l'amylopectine et de l'amylose. Pour les granules d'amidon atténués (en d'autres termes abîmés), les enzymes ajoutés à la pâte, principalement de l'amylase, convertiront l'amidon en maltose. Le maltose servira de nourriture à la levure et aidera au brunissement de la croûte lors de la cuisson.

### 5.2.2-Le sel

Le sel a certes une fonction sur la saveur du pain. Il a cependant un effet sur la levure de par l'augmentation de la pression osmotique. Il influence également la texture de la pâte pendant le malaxage. On utilise pour la plupart des recettes entre 1.75 et 2.25% de sel (base poids farine). Une augmentation de 0.2% de sel est suffisante pour retarder la fermentation. Le sel influencera aussi l'élasticité de la pâte et son goût.

### 5.2.3-Le sucre

Généralement, le sucrose est ajouté au pain comme substrat pour la levure. Il est converti en glucose et fructose par cette dernière. Une partie de ce sucre est converti en  $\text{CO}_2$  par la levure pendant la fermentation. Les sucres résiduels contribuent au goût du pain et à son apparence lorsque ceux-ci réagissent avec les protéines pour former une croûte dorée. Le sucre augmente l'humectance et



améliore la stabilité du produit fini. Il est utilisé à des concentrations allant de 0 à 12% dans les produits de boulangerie variés.

#### 5.2.4-Agents de conditionnement

Il existe plusieurs agents pour améliorer le produit final. Entre autres, les minéraux comme le monocalcium de phosphate pour contrôler le pH de l'eau de la recette, les sels d'ammonium fournissant de l'azote à la levure et les agents oxydants comme l'acide ascorbique servant à augmenter la fermeté de la pâte de par leur action sur les protéines.

#### 5.2.5-La levure

On trouve aujourd'hui la levure de boulangerie sous 2 formes: (1) fraîche qui doit être réfrigérée et (2) sèche pouvant être conservée sans réfrigération. La forme fraîche se présente soit en crème ou comprimée comme un gâteau. Sous cette forme la levure contient environ 70% d'humidité et ne se conserve que 3 à 4 semaines à 4°C. La levure peut être ajoutée directement au pétrisseur sans étape de réhydratation. Malgré une activité et une viabilité accrue des cellules, cette forme de levure est cependant très fragile lorsqu'exposée à des températures plus élevées que 4°C et à l'oxydation aggravée par un emballage exposant le gâteau. Des mauvaises manipulations de la levure comprimée favorisent l'autolyse, entraînant la libération de la glutathione de la levure. La glutathione agit comme un agent réducteur sur le gluten et diminue la fermeté de la pâte. La pâte devient collante et moins élastique. Selon le type de farine utilisée ou le genre de pain désiré, la levure est ajoutée à des taux variant de 1.5 à 10% (base farine). Le pain blanc requiert de 2 à 5% de levure comprimée.

#### 5.2.6-Les huiles et les gras

Les corps gras sont ajoutés dans le but d'obtenir une pâte ayant une texture plus moelleuse et permettre l'expansion des pores créés par la levée. Les pains fabriqués avec ces ingrédients ont plus

de volume, retiennent plus d'humidité, ont une croûte moins dure et sont plus facilement tranchables. Des corps gras d'origine végétale ou animale à des concentrations de 0 à 5 % (base farine) sont utilisés.

#### 5.2.7-Les agents de conservation chimiques

Les ennemis du pain sont principalement les moisissures présentes sur presque tous les produits contenant de l'amidon. Le boulanger rencontre plus fréquemment les espèces appartenant au genre *Aspergillus*, *Penicillium* et *Rhizopus*. Les moisissures sont plus tolérantes aux écarts de températures que les levures. Ainsi, elles pousseront lentement à la réfrigération ou des températures excédant 40°C. Le pain idéal contient un maximum d'humidité sans pour autant avoir de condensation dans l'emballage rendant les conditions presque idéales pour la croissance des moisissures. Le pain est principalement contaminé lors de sa période de refroidissement avant l'étape d'emballage.

Les agents de conservation ne peuvent certes pas remplacer de bonnes pratiques sanitaires. Les boulangeries devraient opérer sous atmosphère positive pour diminuer l'entrée des microorganismes de l'extérieur. L'activité de l'eau, la température d'entreposage et le pH final du produit auront un effet important sur le taux de contamination du pain.

Certaines boulangeries utilisent l'atmosphère modifiée constituée d'azote pour prévenir la croissance des moisissures dans le produit fini lors de l'entreposage. Cependant le consommateur ne bénéficie plus de cette protection lorsque le sac est ouvert.

Plusieurs utilisent des ingrédients antimicrobiens pour retarder la croissance des contaminants sur le produit. Un agent de conservation doit être actif contre une variété de contaminants à basse concentration, ne pas affecter le pH, ne pas modifier le goût du produit, être soluble dans l'eau et bien entendu il doit être peu coûteux. Les agents de conservation sont classés en 2 catégories: les agents chimiques et les agents naturels. Les lois fédérales prescrivent d'inscrire qu'un produit chimique est ajouté comme agent de conservation alors que les agents antimicrobiens naturels sont énumérés

comme les autres ingrédients. Le tableau 3 décrit le spectre d'action des agents de conservation chimiques utilisés en boulangerie.

Tableau 3. Spectre d'action des agents antimicrobiens utilisés en boulangerie

Agent de conservation	pH d'action	Spectre d'action
Benzoates	4.5 ou plus bas	Levures, moisissures, certaines bactéries
Propionates	5.5 ou plus bas	Moisissures, <i>Bacillus mesentericus</i> , peu d'effet sur les levures
Sorbates	6.5 ou plus bas	Levures, moisissures, plusieurs bactéries sauf les lactiques

Tiré de Antimicrobial Agents. 1986. American Institute of baking, technical bulletin, vol.8(2):

Depuis longtemps les sels de l'acide propionique sont reconnus comme étant d'excellents fongicides. Ils inhibent non seulement les moisissures mais également certaines bactéries. L'ajout d'un sel d'acide propionique prévient un défaut de formation de chaînes (ropiness) dans la mie du pain provoqué par la bactérie *Bacillus mesentericus*. Les spores de cette bactérie survivent aux températures élevées de cuisson et peuvent commencer leur croissance végétative lors de la période d'entreposage.

L'acide propionique retarde la croissance des moisissures de 6 à 7 jours sans inhiber la fermentation par la levure. Dans les produits de boulangerie, le propionate de sodium est plus utilisé car on croit que le calcium du propionate interagit dans les réactions de levée du pain. Les sels d'acide propionique sont *GRAS* (Generally Recognized As Safe) et peuvent être utilisés dans le pain à une concentration de 2000 ppm (base farine). Dans les muffins anglais ou les mélanges à gâteaux, la concentration permise est doublée.

#### 5.2.8-Agents de conservation "naturels"

Les consommateurs sont de plus en plus soucieux de leur alimentation et voient d'un oeil critique l'utilisation des agents de conservation dans les aliments. Ces tendances vers l'élimination des agents de conservation chimiques du pain ou des autres produits de boulangerie tel le propionate calcium augmente le risque de contamination par les moisissures ou par des souches de *Bacillus* (Holy, 1994). Les agents de conservation chimiques peuvent être remplacés par des produits d'origine naturelle. Le vinaigre, le concentré de jus de raisin et des produits fermentés de céréales ou d'origine laitière sont des exemples d'agents de conservation naturels.

Une solution d'acide acétique est beaucoup moins efficace contre les moisissures que l'acide propionique. Ce produit peut également amener des odeurs indésirables dans le produits de boulangerie. Le concentré de raisin est utilisé dans les pains pouvant bénéficier d'un changement de couleur et d'un goût sucré. Il est ajouté à des concentrations de 5 à 10 % (base farine).

On retrouve sur le marché des produits fermentés ayant des propriétés antifongiques. L'effet est possiblement dû à la production d'acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide propionique) pendant la fermentation. On rapporte cependant qu'il faut ajouter jusqu'à 10 fois la concentration de l'acide lui-même pour obtenir la même inhibition. Ces produits ne doivent pas être étiquetés comme agents de conservation, ce qui représente un avantage du point de vue de la mise en marché.

## 6 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

### 6.1 Hypothèses

- Il est possible de produire un agent de conservation d'origine naturelle par la fermentation d'un milieu contenant une concentration élevée d'extraits de levure. La production du métabolite pourra être optimisée en utilisant des biomasses concentrées et en ajustant certains paramètres de fermentation.
- L'utilisation du milieu fermenté contenant de l'acide propionique en panification augmentera la durée de conservation du pain comparativement à un pain n'en contenant pas.
- L'utilisation du milieu fermenté contenant l'extrait de levure en panification augmentera l'activité de la levure lors de la levée du pain.

### 6.2 Objectifs

- Les fermentations permettront d'évaluer le potentiel de *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* pour produire de l'acide propionique sur un milieu contenant 7 et 10% d'extrait de levure.
- Divers paramètres de fermentation seront étudiés dans le but d'optimiser la production de composés antifongiques sur milieu riche en extraits de levure.
- Les cellules immobilisées seront réutilisées en fermentations répétées dans le but d'en étudier l'effet sur la biomasse et sur la production de métabolites.
- Le pouvoir antifongique et stimulant pour la croissance de la levure des poudres provenant des fermentations sera étudié sur des pains contenant les extraits de levure riches en acide propionique.
- Une méthode rapide de dénombrement pour *Propionibacterium shermanii* sera mise au point .

## CHAPITRE II

### PROCÉDÉS DE FERMENTATION et PRODUCTION DES EXTRAITS RICHES EN ACIDE PROPIONIQUE

#### 1 INTRODUCTION

Les extraits de levure sont ajoutés aux milieux de culture comme source de facteurs de croissance. Certains composés des extraits de levure ont été identifiés comme stimulateurs chez les bactéries lactiques, particulièrement les acides aminés (Smith et al., 1975). Habituellement les extraits de levure sont ajoutés au milieu de culture à une concentration de 0.5 à 2%. Nos essais ont été effectués à 7% d'extraits de levure et certains essais préliminaires à 10%. Ces concentrations furent choisies selon le procédé industriel d'autolyse générant des solutions ayant ces concentrations. Il a été démontré que *Propionibacterium* utilise plusieurs sources de carbone mais la croissance est plutôt lente. Dans un milieu contenant un substrat mixte de glucose et de lactate, *Propionibacterium* utilise préférentiellement le lactate (Lee et al., 1974). Le lactate de sodium stimule la production d'acides propionique et acétique (El-Hagarawy et al., 1954). Dans l'éventualité d'une assimilation rapide du lactate, une source carbonée pourrait possiblement stimuler la production des acides organiques d'intérêt. Le glucose a été préféré au lactose car toutes les souches de *Propionibacterium* n'assimilent pas le lactose.

De plus, étant donné que la souche *Propionibacterium* se caractérise par une croissance lente, il apparaissait nécessaire de concentrer les cellules sur un support d'alginate et ainsi d'éviter les longues

périodes de latence.

Cette étude avait pour but d'optimiser un milieu à haute teneur d'extraits de levure pour la production d'acide propionique, de vérifier l'effet des fermentations successives sur la stabilité des biomasses incluses et de mettre au point une méthode de dénombrement de *Propionibacterium*. L'effet de la qualité de l'extrait sur la production de biomasse et d'acides organiques fut étudiée.

## 2 MATÉRIELS et MÉTHODES

### 2.1 Microorganisme

La souche de *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* fut obtenue de la collection du Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments (St-Hyacinthe, Québec) et porte le nom de code Pr9000. La souche fut réactivée à partir d'une culture lyophilisée dans un milieu de réhydratation contenant 1.5% de tryptone, 1.0% de peptone et 0.5% d'extraits de viande à son volume original pendant 10 min à température pièce. La souche fut ensuite resuspendue à 1% (v/v) dans un milieu lactate pour les repiquages hebdomadaires et incubée à 30°C pendant 48 heures.

Un stock de la souche fut préparé en ajoutant 1 mL de la culture dans 4 mL d'une solution de lait écrémé 20% (p/p) stérilisée à 115°C, 10 min et de glycérol 20% stérilisée à 121°C, 15 min. Le mélange fut ensuite congelé à -70°C. A tous les mois, une culture congelée était réactivée et repiquée dans le milieu lactate 2 fois avant son utilisation.

### 2.2 Milieux de culture

Le milieu lactate (LAC) contenant 2% de lactate (sodium lactate 60%, Fisher, Nepean, Ont., Canada), 0.5% de peptones pancréatiques de caséines, 0.5% d'extrait de levure (Oxoid, Nepean, Ont., Canada) et 0.5% de CaCl<sub>2</sub>, autoclavé à 121°C, 15 min a été utilisé pour les repiquages de la souche bactérienne et comme milieu de référence. Pour les fermentations, le milieu YE contenant 7 ou 10% d'extraits

de levure de sources variées, 2% de lactate à moins d'avis contraire et de 0.5% de  $\text{CaCl}_2$  fut utilisé. Pour les fermentations, le milieu fut supplémenté de 1 % de glucose.

### **2.3 Immobilisation**

La souche produite sur milieu lactate fut repiquée 2 fois avant d'être utilisée pour l'immobilisation. La culture était ensuite centrifugée à 5000 g, 15 min. et les cellules resuspendues dans de la peptone stérile à 0.1% pour les concentrer d'un facteur de 20. Les cellules concentrées étaient mélangées à à 2% d'alginate (BDH, Sobalg 126) stérile dans un rapport de 1:1. Cet alginate fut sélectionné pour sa grande force mécanique sous forme solide et sa faible viscosité sous forme liquide. La suspension fut ajoutée goutte à goutte dans du  $\text{CaCl}_2$  à 0.1 M. Les billes étaient laissées dans le calcium 1 heure pour permettre leur durcissement. Elles furent ensuite décantées du calcium et rincées avec de la peptone à 0.1%.

### **2.4 Production des cellules libres**

Pour les fermentations en cellules libres, le milieu lactate fut inoculé avec 1% de la culture. Après incubation, les cellules furent centrifugées à 5000 g, 15 min et les cellules resuspendues dans de la peptone 0.1% pour les concentrer 10X.

### **2.5 Mise au point des méthodes de dénombrement des bactéries viables**

La méthode classique de dénombrement de *P. shermanii* fut comparée à deux méthodes nouvelles dans l'espoir de diminuer le temps d'exécution et le temps d'incubation de la souche. Dans tous les cas lorsque la souche était incluse dans l'alginate, une portion des billes fut prélevée avec une pissette (environ 0.5gramme), pesée et suspendue dans 100 mL de citrate de sodium à 1%. Les billes furent ensuite homogénéisées à l'aide d'un homogénéisateur Omni 2000 utilisé à vitesse maximale pendant 1 min. L'homogénat était dilué dans de la peptone stérile à 0.1% et le nombre de cellules viables évalué. Lors des dénombrements sur milieu solide, les plaques furent initialement incubées dans 3



environnements différents: à l'air, en jarre chandelle et en anaérobiose totale. Cependant, il s'avéra que notre souche est une bactérie anaérobie stricte et donc les comptes suivants furent exécutés en jarre anaérobie.

### *1. Dénombrement sur milieu solide ("pour plate")*

*Propionibacterium* fut dénombré sur agar lactate constitué de 2% de lactate, 0.5% de peptones pancréatiques de caséines 0.5% d'extraits de levure (Oxoid) et 1.5% d'agar. Après avoir dissous les ingrédients, le milieu fut autoclavé à 121°C pendant 15 min. Les plaques furent incubées 4 à 5 jours à 30°C en conditions anaérobies dans des jarres en utilisant des enveloppes "Gas Pak" (BBL) pour générer de l'hydrogène (90%) et du CO<sub>2</sub> (10%). Les colonies furent dénombrées sur un compteur de colonies standard.

### *2. Méthode du Petrifilm*

Cette méthode est une modification de la méthode des comptes viables sur milieu solide. Le Petrifilm (Plate Count Agar, 3M, St-Paul, USA) est un système à double couche, réhydratable par l'échantillon dilué. Le film est ensuite incubé à la température désirée. Trois variantes de Petrifilm sont actuellement disponibles soit le compte total (Standard Methods agar), le compte coliforme (Violet Red Bile agar) et le levures et moisissures (Potato Dextrose agar) .

L'échantillon fut déposé entre les films avec 1 mL de la dilution appropriée et il fut ensuite étalé avec l'anneau fourni à cet effet en appliquant une légère pression sur la surface du film supérieur. Les plaques furent laissées ainsi 1 min pour permettre au gel de solidifier et furent ensuite placées à l'icubateur à 30°C pendant 24-48 hres. Les colonies furent dénombrées sur un compteur de colonies comme pour les plaques d'agar. Les colonies apparaissaient comme des points rouges dû au colorant tétrazolium (TTC) présent.

### 3. Méthode du Live Dead BacLight

Cette méthode consiste en une observation microscopique en fluorescence. Le mélange de colorants fourni par le manufacturier (Molecular Probe, CA, USA) est spécifique pour certains composés des membranes cellulaires. Le Live/Dead BacLight Viability Kit utilise un mélange d'acides nucléiques de vert fluorescent et de rouge fluorescent (le propidium d'iode). Lorsqu'utilisé seul le colorant vert (SYTO 9) colore toutes les bactéries d'une population. Au contraire, le propidium d'iode pénètre seulement les bactéries ayant des membranes endommagées, compétitionnant avec le colorant SYTO 9 pour les sites d'attachement des acides nucléiques. Ainsi les bactéries viables offrant une bonne intégrité membranaire se colorent en verts et sont visibles avec un filtre I<sub>2</sub>, alors que les cellules mortes ou abîmées seront rouges et observables avec un filtre N<sub>2</sub>. Cette méthode offre l'avantage certain d'une réponse rapide et directe et de déterminer le taux de viabilité de la culture.

Lors du dénombrement, 50 µL de la culture furent resuspendus dans 1 mL d'eau stérilisée par filtration. L'échantillon fut centrifugé 5 min dans une microcentrifugeuse à 10000 g pour retirer toute trace de milieu. Le culot fut resuspendu dans 1 mL d'eau filtrée. A cet échantillon, 3µL des colorants préparés selon les recommandations du manufacturier furent ajoutés. Le mélange fut ensuite incubé dans le noir à 22°C pendant 30 min. Après l'incubation, le mélange fut ajouté à 1 mL d'agar refroidi à 45°C (0.7%, Difco, Détroit, Mi.,USA) contenu dans un tube stérile. Après agitation, 10 µl du mélange culture/agar furent prélevés et placés entre lame et lamelle. L'observation microscopique se faisait immédiatement après la préparation. Les bactéries oranges/rouges (mortes) furent observées avec un filtre N<sub>2</sub> 530-580 nm (Leitz, Suisse) et pour les vertes (vivantes) avec un filtre I<sub>2</sub> 450-490 nm (Leitz) sous huile à 1000X de grossissement. Le champ microscopique fut mesuré à l'aide d'une lame graduée (Fisher). Au moins 10 champs furent dénombrés pour chaque échantillon et chaque échantillon fut exécuté en duplicata. La moyenne des champs fut multipliée par le facteur microscopique calculé pour la lame et le champs microscopique spécifique (annexe B). Tous les dénombrements microscopiques furent comparés à une mise en plaque sur milieu lactate et sur Petrifilm en anaérobiose complète.

## 2.6 Analyse des métabolites

Les échantillons provenant des milieux de culture ou de fermentation furent centrifugés à 3000 rpm pendant 20 min. pour retirer les cellules. Le surnageant fut ensuite filtré à l'aide de membranes micro poreuses de 0.45µ (Filtres HVLP, Millipore, Milford, Mass., USA). Les sucres contenus et les acides produits furent mesurés par HPLC basée sur la méthode de Doyon *et al.* (1991). Les échantillons furent injectés à l'aide d'un échantillonneur automatique 717 de Waters (Mississauga, Ont., Canada) sur une colonne Aminex HPX 87H (300 X 7.8 mm) de BioRad (Mississauga, Ont., Canada) maintenue à 40°C couplée à une pré-colonne de garde. L'éluant était composé d'acide sulfurique 0.008N (Baker, Toronto, Ont., Canada) et son débit était maintenu à 0.4 mL/min. Les composés furent détectés par un moniteur d'indice de réfraction 410 de Waters maintenu à 40°C. Les données furent recueillies et analysées par le logiciel Millenium 2.10 de Waters. Les solutions étalon (glucose, acides lactique, acétique et propionique), qui ont permis de quantifier les échantillons, étaient des standards de haute pureté analytique de Sigma Chemical Co (St-Louis, Mo., USA). Le temps d'analyse était de 40 minutes.

## 2.7 Fermentations

### 2.7.1-Fermentations en flacons

Certaines fermentations furent effectuées dans des flacons de 1Lensemencés avec 20% de la souche (c'est-à-dire avec 200 g de billes par litre de milieu) et incubés avec agitation de 100 rpm pour maintenir les billes en suspension dans le milieu. Les fermentations furent effectuées dans le milieu à 7% d'extraits de levure (YE) additionné de 0.5% de CaCl<sub>2</sub> pour éviter la dépolymérisation des billes lors de la fermentation. Les fermentations étaient maintenues à 37°C. Pour effectuer des fermentations successives, les billes étaient décantées stérilement dans un Buchner, rincées avec 100 mL de peptone (0.1%) et remises dans du milieu frais YE. Les fermentations furent effectuées en duplicata.

### 2.7.2-Fermentations en bioréacteurs

Les fermentations générant les poudres fermentées ont été réalisées dans un bioréacteur Biostat M, B. Braun (Allemagne) de 1.7 litre (planche 1) en utilisant un volume de 1 litre. L'inoculum en bille était aussi constitué de 20% de bille (p/vol). La température fut maintenue à 37°C et l'agitation fixée à 60 rpm. A la différence des fermentations en flacons, le pH fut contrôlé à 6.2 avec du NaOH 5N. Les milieux utilisés étaient tous constitués de 2% de lactate, 1% de glucose, 0.5% de CaCl<sub>2</sub> et de 7 % d'extraits de levure. Trois extraits de levure différents furent utilisés soit l'extrait Oxoid (Ox2100), qui est un extrait de levure de boulangerie utilisé pour la production des microorganismes; un autre extrait de levure de boulangerie produit par la compagnie Lallemand (La3065) et finalement un extrait de levure de brasserie produit par la compagnie Champlain (Ch0700). Après 48 heures de fermentation, les billes furent décantées, rincées et resuspendues dans du milieu frais dans le bioréacteur stérilisé. Trois fermentations successives furent effectuées pour chaque extrait utilisé avec les mêmes billes. Les trois milieux fermentés furent analysés (dénombrement bactérien, HPLC) et congelés à -20°C jusqu'au moment du séchage.

### 2.8 Séchage par atomisation

Au moment du séchage, les milieux fermentés furent décongelés, et leur pH ajusté à 7.0 avec du NaOH 5N pour éviter que les acides organiques contenus dans les milieux ne se volatilisent. Les milieux furent placés sur une plaque agitatrice pour assurer l'homogénéité du milieu pendant le procédé.

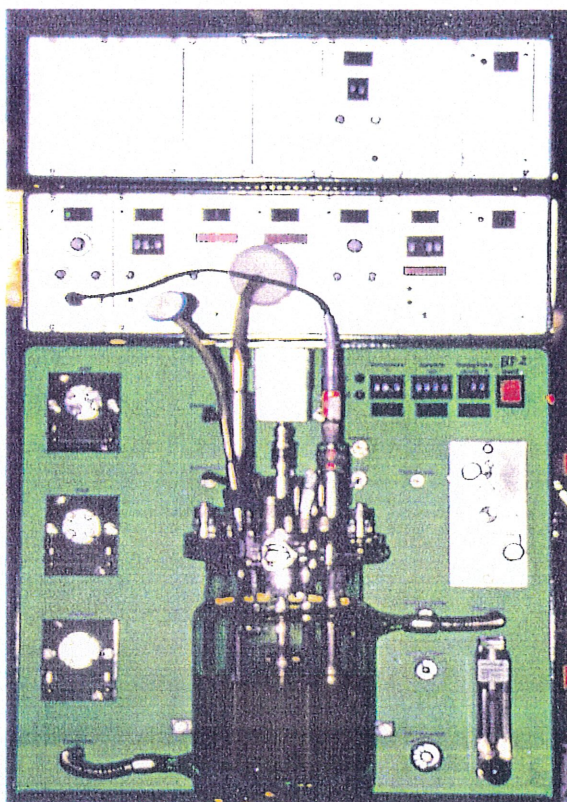
Le séchoir utilisé était un mini-séchoir atomiseur de Büchi B-191 (Flawil, Suisse, planche 1) d'une capacité maximale de débit d'air de séchage de 35 m<sup>3</sup>/h. Le débit d'air d'entrée était maintenu constant à 700 mL/h. Environ 50 mL d'eau furent passés au préalable pour ajuster la température de sortie du séchoir. L'aspiration fonctionnait à 100 % de la capacité. La température d'entrée du produit fut fixée à 150°C ce qui avec le débit d'entrée de pompe de produit utilisé résultait en une température de sortie de 107-110°C. La pompe d'entrée de produit fonctionnait à 10 % de sa capacité

maximale équivalent à environ 200 mL de milieu séché à l'heure. Le séchoir était démonté et lavé entre chaque milieu. La poudre récupérée de chaque fermentation et de chaque essai était pesée et entreposée à 4°C dans un contenant scellé.

## **2.9 Analyse statistique**

Les résultats obtenus sont les valeurs moyennes de 2 essais indépendants. Le logiciel Instat fut utilisé pour comparer l'effet de la source de l'extrait sur les rendements en acide propionique et sur l'effet des fermentations successives. Les barres d'erreur sur les figures représentent l'erreur standard calculée sur la moyenne.

Fermenteur Biostat M, Braun de 1.7 litre



Séchoir atomiseur Büchi, B-191

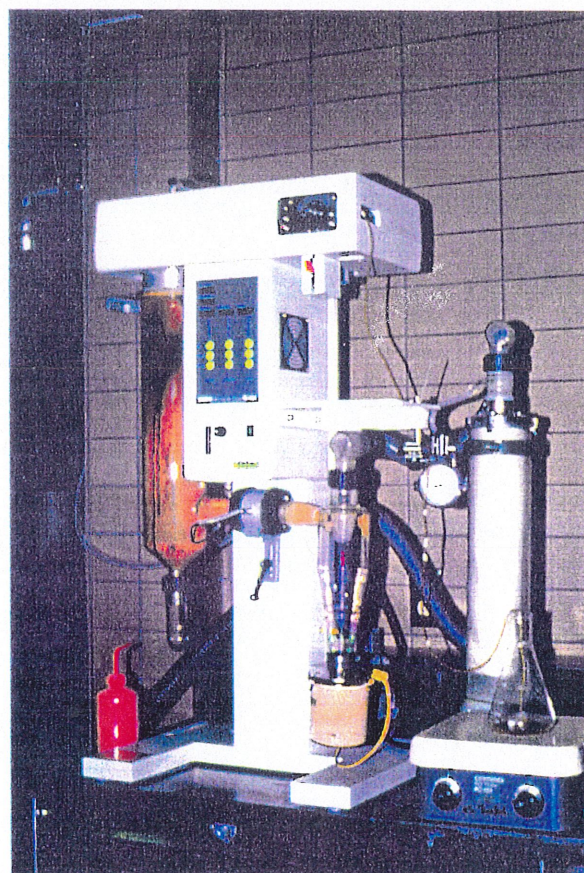


Planche 1: appareils utilisés pour la production des poudres riches en acide propionique



### 3 RÉSULTATS et DISCUSSION

#### 3.1 Résultats des méthodes de dénombrement

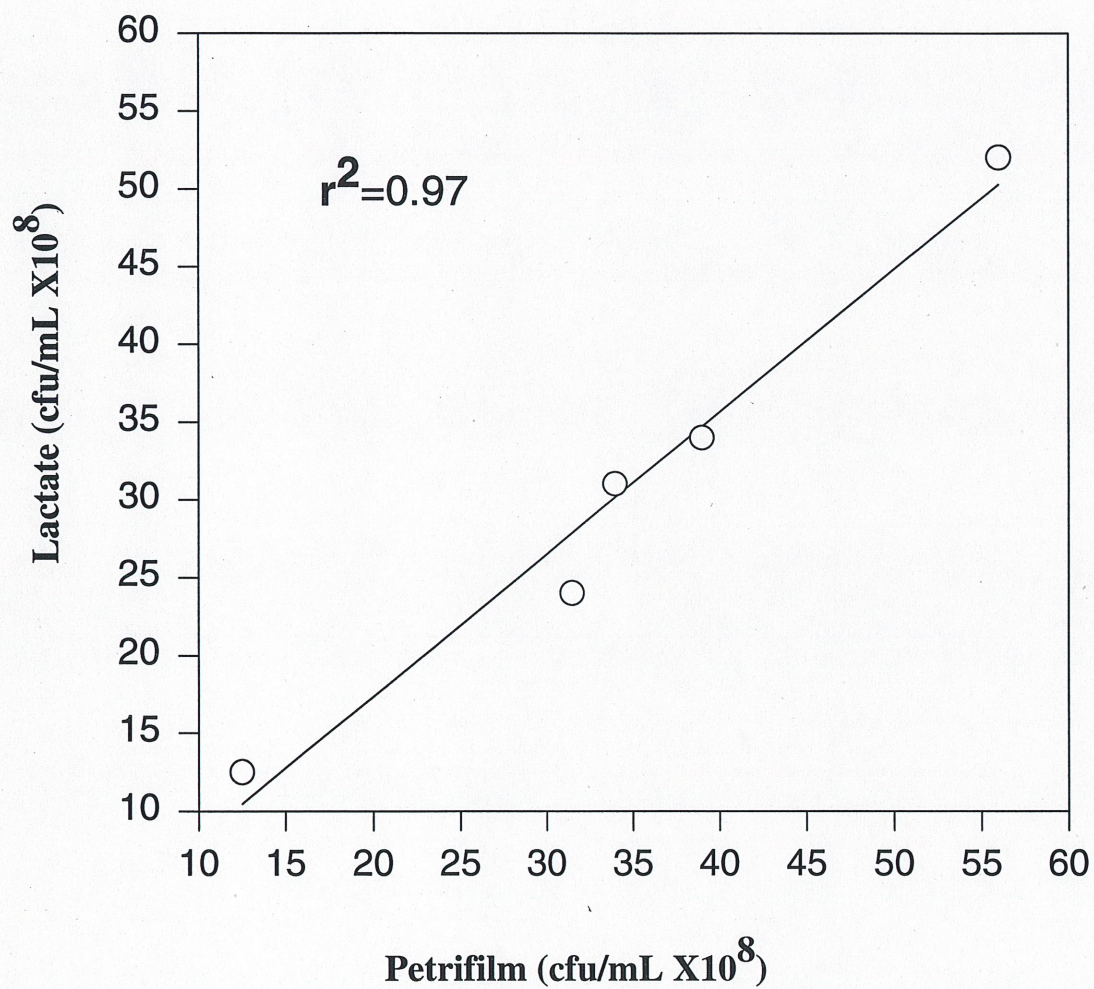
##### 1. *Atmosphère d'incubation*

Chaque essai fut exécuté à partir d'une culture différente produite sur bouillon lactate. Lorsqu'incubé à l'air ou en jarre chandelle, il n'y a pas d'apparition de colonies ni sur Petrifilm, ni sur milieu solide lactate même après 14 jours. Le feuillet de Petrifilm n'a donc pas réussi à réduire suffisamment les tensions d'oxygène pour permettre à la souche de croître. Les essais suivants furent donc tous incubés dans des conditions anaérobies strictes.

##### 2. *Petrifilm vs Lactate*

Sur Petrifilm, notre souche de *Propionibacterium* forme des colonies rouges démontrant qu'il réduit le chlorure de triphényl de tétrazolium (TTC). Les faibles différences observées avec Petrifilm et avec lactate sont probablement dues à un stress thermique moins grand lorsque la bactérie est ensemencée sur Petrifilm que lorsque coulée dans l'agar à 45°C. Lorsque dénombré sur agar, on recommande de couler *Propionibacterium* dans l'agar (pour plate) pour réduire l'exposition du microorganisme à l'oxygène. La corrélation entre la méthode du Petrifilm et milieu lactate est cependant très bonne (0.97) (figure 1). Il n'y a pas de différence significative entre la méthode de dénombrement sur Petrifilm et sur milieu lactate ( $P > 0.05$ ).





**Figure 1. Relation entre la méthode du Pétrifilm et la mise en plaque pour le dénombrement de *Propionibacterium***



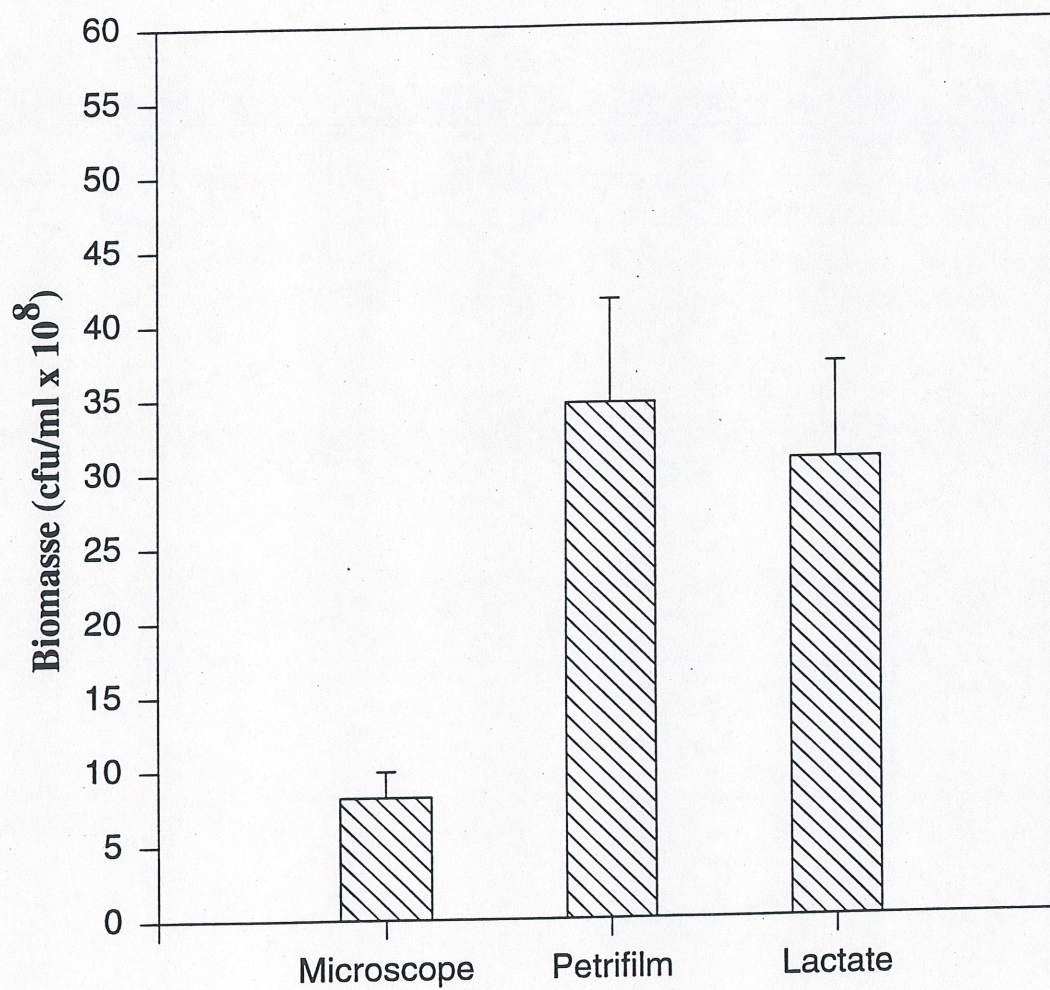
### 3. Microscopie en fluorescence

Le protocole proposé par Molecular Probe n'est pas conçu pour dénombrer les microorganismes mais pour les observer uniquement. Dans notre cas, la concentration du colorant et le temps d'incubation coloration/souche ont été doublés pour augmenter la fluorescence. De plus pour éviter les mouvements bactériens, une faible concentration d'agar à 45°C fut ajouté au mélange. La corrélation ( $r^2$ ) entre le dénombrement par fluorescence et croissance sur plaque est faible. Elle est de 0.44 pour la méthode microscopique et le Petrifilm et de 0.52 pour la méthode microscopique et le dénombrement sur milieu lactate. Les comptes obtenus avec l'observation microscopique sont significativement moins élevés que sur Petrifilm ou milieu lactate. On observe de 2 à 10 fois moins de microorganismes viables sur lame que sur Pétri (figure 2). Lors de l'observation, il fallait constamment manipuler la vis du micrométrique pour visionner les bactéries en position plus basse dans l'agar. On a observé des phénomènes de quench lorsque les échantillons étaient en suspension dans des solutions visqueuses (Rost, 1992). L'épaisseur du film de la suspension (10 $\mu$ L) aurait possiblement avantage à être réduit au minimum toujours en couvrant la surface à cause de sa forme solide. L'arrivée de la lumière en fluorescence se fait par le haut de l'échantillon et il est possible que la lumière n'ait pas excité les fluorochromes du fond ou que la fluorescence ne soit pas visible.

La mise au point d'une méthode de dénombrement directe comme celle du Molecular Probe exige de nombreuses répétitions comparatives avec la méthode de dénombrement conventionnelle. La courbe de corrélation doit également être étalée sur un échelle reflétant plusieurs situations de croissance. Le seuil de détection se trouve cependant élevé à 1 x 10<sup>6</sup> cfu/mL étant donné qu'un très petit volume de culture est observé à la fois (voir annexe B pour un exemple de calcul du facteur microscopique). Il serait donc nécessaire, avec multiples répétitions, d'étaler la courbe de 1 x 10<sup>6</sup> cfu/mL jusqu'à 1 x 10<sup>10</sup> cfu/mL pour déterminer son équation et déterminer le coefficient de corrélation.

L'observation directe avec ces colorants commerciaux demeure donc une méthode alternative attrayante malgré le fait qu'il faille confirmer sa précision pour chaque souche. Mais il en va de





**Figure2. Comparaison entre les méthodes de dénombrement pour *Propionibacterium***



même pour le Petrifilm. Il était également très aisé de dénombrer les bactéries et de distinguer les mortes (rouges) des vivantes (vertes) car les cellules montraient une coloration fluorescente intense sur un fond noir (planche 2). L'avantage de cette technique réside dans sa rapidité d'exécution et d'obtention des résultats. De plus, l'observation révèle l'état de la culture en différenciant les mortes des vivantes. Sous certaines conditions cependant, l'intégrité membranaire d'une bactérie peut être compromise et quand même être capable de se reproduire; ces bactéries ayant été dénombrées comme mortes dans l'essai. De même, certaines bactéries peuvent être qualifiées de vivantes à l'observation microscopique sans être capables de se reproduire dans un milieu solide.

Les principaux désavantages de la méthode directe de dénombrement sont sa faible sensibilité (haut seuil de détection) et sa dépendance des facteurs environnementaux comme la température, le pH, la viscosité et la force ionique du milieu. De plus, nous avons observé des phénomènes de pâlissement. L'intensité de la fluorescence diminuait de façon remarquable spécialement lorsqu'exposé à la lumière du microscope (photobleaching). Cette réaction nuit considérablement à la quantification des biomasses. On pense que le pâlissement est dû à une réaction entre le fluorophore et l'oxygène qui formera un produit non fluorescent (Rost, 1992). Il faut donc observer la lame dès sa coloration et dénombrer immédiatement. Les colorants sont souvent considérés comme toxiques et mutagènes (comme l'acridine orange et la fluorescein). Il faut donc prévoir des méthodes de protection pour la manipulation des frottis, ce qui complique l'observation microscopique.

La méthode du Petrifilm peut donc être utilisée avec l'assurance que les comptes reflètent ceux des mise en plaque conventionnelles. Tant qu'à la méthode en microscopie, elle nécessite de la mise au point et des études comparatives pour être considérée comme fiable.



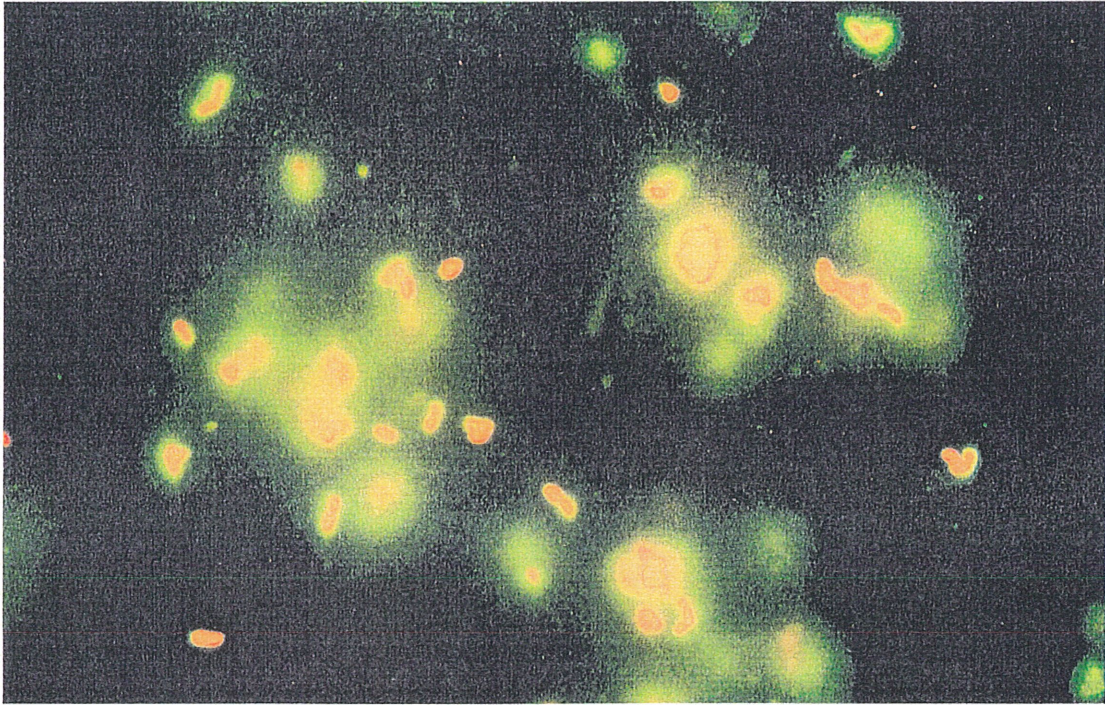


Planche 2 : *Propionibacterium* en microscopie en fluorescence 1000X

#### 4. Dénombrement lors des étapes de fabrication de billes

L'immobilisation d'une culture concentrée implique plusieurs manipulations qui pourraient s'avérer stressantes pour la culture utilisée. Ainsi, les étapes d'homogénéisation, de centrifugation, de dépolymérisation, d'immobilisation ont été évaluées pour leur effet sur la viabilité de *P. shermanii*.

Tableau 1. Effet des étapes d'immobilisation et d'homogénéisation sur la viabilité de *P. shermanii*

Manipulations effectuées	Biomasse*	Biomasse théorique
Culture-mère sur lactate	$4.3 \times 10^8$	---
Homogénéisation avec Omni 2000 de la culture-mère	$5.6 \times 10^8$	$5.6 \times 10^8$
Trempage 30 min. dans peptone et homogénéisation	$6.9 \times 10^8$	$6.9 \times 10^8$
Trempage 30 min. dans citrate et homogénéisation	$8.2 \times 10^8$	$8.2 \times 10^8$
Culture non concentrée, immobilisée	$1.9 \times 10^8$	$2.8 \times 10^8$
Culture non concentrée, immobilisée, trempage dans $\text{CaCl}_2$	$5.0 \times 10^8$	$2.8 \times 10^8$
Culture centrifugée, immobilisée dans l'alginate	$4.5 \times 10^9$	$5.6 \times 10^9$
Culture centrifugée, immobilisée, trempage dans $\text{CaCl}_2$	$2.2 \times 10^9$	$5.6 \times 10^9$

\*exprimée en cfu/g de bille ou mL de suspension

Le tableau 1 révèle que les étapes d'immobilisation et d'homogénéisation pour le dénombrement ont peu d'effet sur la biomasse utilisée. Ainsi, lorsqu'homogénéisées avec l'Omni 2000 1 min. à vitesse maximale, le nombre de cellules a légèrement augmenté par rapport à la culture-mère peut-être dû aux amas ou aux chaînes qui ont été brisés par l'homogénéisation. De même, les trempages de la culture-mère dans la peptone ou le citrate ont été bénéfiques pour la biomasse. Il a été démontré que certaines souches de *Propionibacterium* sont capables de métaboliser le citrate (Hettinga et Reinbold II, 1972). Dans les fromages, le citrate sera réduit par les propionibactéries lorsque le lactate est présent.

L'immobilisation dans l'alginate a réduit le nombre de cellules viables mais d'une façon beaucoup moins importante lorsque les cellules étaient concentrées. Le trempage dans le calcium ne semble pas affecter la souche. Dans le but de découvrir si l'alginate a un effet toxique pour la souche *Propionibacterium*, une culture fut mise en plaque dans le milieu lactate contenant des concentrations variant de 0 à 2 % d'alginate, ce qui correspond aux concentrations rencontrées lors du processus d'immobilisation. (Tableau 2).

Tableau 2. Effet de l'alginate sur la viabilité de la souche

Mise en plaque	Dénombrement (CFU/mL)
Lactate	$3.6 \times 10^8$
Lactate additionné de 1% d'alginate	$2.9 \times 10^8$
Lactate additionné de 2% d'alginate	$2.5 \times 10^8$

L'alginate n'affecte pas de façon significative la biomasse. Malgré une tendance à la baisse de la biomasse selon les traitements, les colonies se sont développées au même rythme et leur grosseur était semblable dans tous les cas. Il y aurait cependant un avantage certain à vérifier la compatibilité de la souche avec différents alginates et de s'assurer que l'alginate est neutre quant à son effet sur la survie des populations encapsulées.

### 3.2 Concentration en extraits de levure

Le choix d'une concentration en extrait de levure fut fixé par rapport à la croissance de *P. shermanii* et aux rendements en acide propionique. Le milieu lactate (LAC) nous servit de milieu de référence en comparaison avec les milieux riches en extrait de levure (YE). Les deux autres milieux contenaient 7 et 10 % (p/p) d'extrait de levure. Pour ces essais préliminaires, le milieu ne contenait pas de glucose. Les milieux furent inoculés avec 1 % des cellules libres non concentrées de la souche produite sur milieu lactate (LAC). Les biomasses furent dénombrées après 48 heures de fermentation alors que les métabolites furent analysés au bout de 5 jours.

La souche de *P. shermanii* montrait une bonne croissance même aux concentrations élevées de solides dans le milieu (tableau 3). Cependant les analyses chimiques révèlent qu'à 10 % d'extrait, peu d'acide lactique est métabolisé au bout de 24 heures alors qu'à 7 % de solides, presque la moitié du substrat est métabolisé. De même au bout de 5 jours, 2 fois plus d'acide propionique fut obtenu avec le milieu contenant 7 % d'extrait de levure. Il faut cependant noter que les rendements en acide propionique étaient supérieurs avec le milieu lactate qu'avec les milieux riches en extrait de levure.

Tableau 3. Effet du milieu sur la biomasse et la production d'acides organiques chez *P. shermanii* en cellules libres.

	Milieu lactate (LAC)	Extrait de levure 7% (YE 7%)	Extrait de levure 10% (YE 10%)
Acide acétique*	0.79	0.73	0.58
Acide propionique*	1.41	1.31	0.38
Biomasse (cfu/mL)	$3.2 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$	$2.6 \times 10^8$

\*exprimé en g/100 mL de milieu

Le milieu YE 7 % a donné significativement moins de biomasse que le YE 10% cependant les rendements en acide propionique furent supérieurs à 7 % et se rapprochèrent des rendements obtenus avec le milieu lactate. Etant donné que c'est le rendement en acides organiques qui importe et non en biomasse, le milieu YE 7% a donc été sélectionné car il semblait plus approprié pour la production d'acide propionique. De plus, le rapport propionate/acétate est plus bas avec 10% d'extrait de levure ce qui n'est pas désirable.

Chez les bactéries lactiques, on a observé des phénomènes de découplage entre la croissance bactérienne et l'acidification. On associe ce phénomène à la température, à la baisse de pH ou à l'accumulation du lactate (Champagne *et al.*, 1992; Champagne, 1998). Dans le cas du milieu YE 7%, les acides, même à ces concentrations élevées, ne semblent pas être à l'origine du phénomène de découplage car le milieu LAC a produit autant d'acides et une bonne biomasse. Même sans glucose



ajouté, les pH ont diminué de la même façon dans les milieux à haute teneur d'extrait de levure soit de 1.2 unité alors que dans le milieu lactate, le pH se situait à 0.8 unité plus bas à la fin de l'incubation. Il semble donc que l'inhibition de la fermentation serait davantage attribuable à la nature du milieu YE 10%. La forte teneur en solides semble inhiber le métabolisme de la souche sans affecter la biomasse finale. Des phénomènes similaires ont été observés avec des bactéries lactiques ayant poussé sur un milieu riche en extraits de levure (Gaudreau *et al.*, 1997)

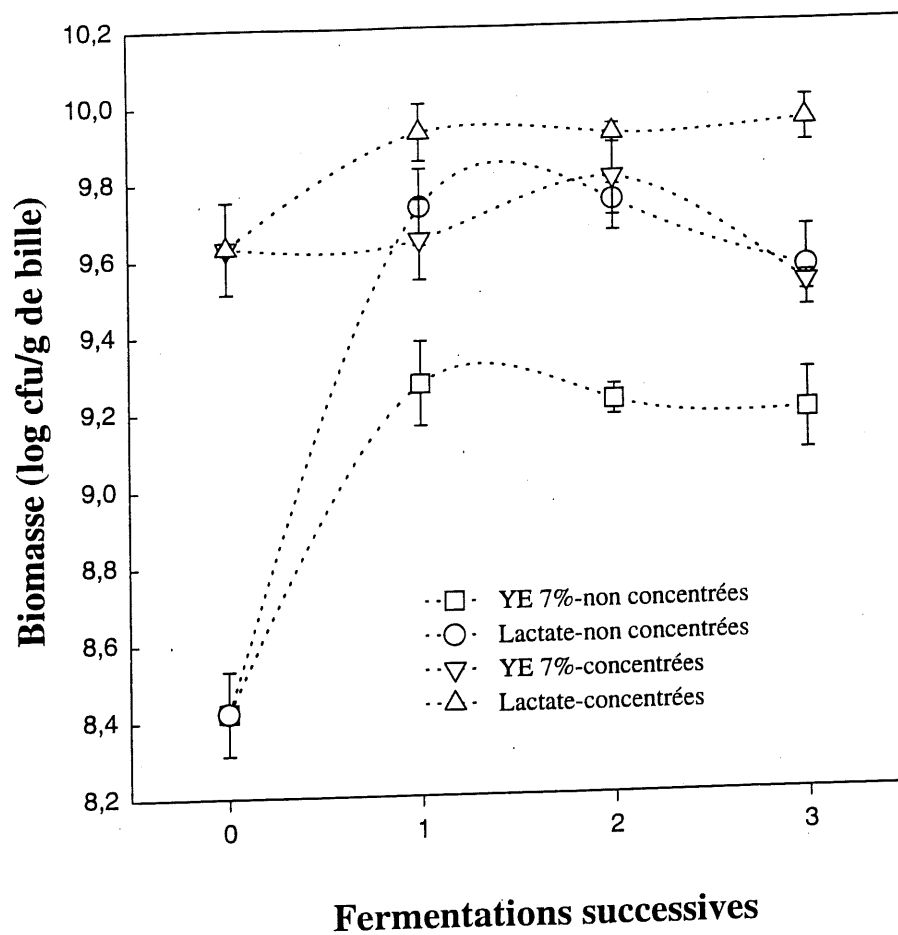
### 3.3 Fermentations successives en flacons

Lors des premiers essais de fermentations avec les billes, au bout de la 4<sup>ième</sup> fermentation, les billes s'étaient complètement dissoutes. Il faut dire également qu'une perte de fermeté a été observée lors des premières fermentations. Le calcium ajouté au milieu de fermentation (0.5%) a corrigé la situation. Les billes ont perdu quand même de la fermeté au cours des fermentations mais sont demeurées intègres.

Avec des cellules concentrées, le nombre de cellules n'a pas augmenté de façon importante dans les billes même au terme de 3 fermentations (figure 3). Le milieu lactate a favorisé la production de biomasse comparé au milieu riche en extraits de levure. Le milieu lactate a rendu une population de bactéries significativement plus élevée que le milieu extrait de levure ( $P < 0.05$ ). Dans le milieu lactate, les populations ont démontré une meilleure croissance avec une population qui se maintenait autour du  $10^{10}$  cfu/g de billes alors que le milieu YE 7% a rendu une biomasse 3 fois moins importante et qui diminuait au bout de la 2<sup>ième</sup> fermentation. Lors de fermentations simples, la biomasse relarguée est passée de  $1 \times 10^5$  cfu/mL à  $5 \times 10^6$  cfu/mL. Cependant, pour les fermentations successives, le nombre de cellules relarguées dans les milieux LAC et YE a augmenté d'un facteur de 100 au cours des 3 fermentations, ce qui démontre que les milieux étaient aptes à supporter la croissance de la souche d'intérêt.

Les essais préliminaires ont démontré que la souche de *P. shermanii* était capable de croître sur le milieu riche en extrait de levure. Les méthodes de dénombrement ont été également vérifiées sans





**Figure 3. Effet du milieu et de la population initiale de *Propionibacterium* dans les billes**

qu'aucun effet significatif ne soit observé sur la viabilité de la souche. Dans tous les essais, sauf dans les essais préliminaires, une culture concentrée fut utilisée lors des fermentations. Dans le but de vérifier si le peu de croissance serait dû à une inhibition de croissance des populations bactériennes dans la matrice d'alginate, une population non concentrée futensemencée dans les milieux lactate et YE 7% avec la différence que ces milieux furent additionnés de 0.5% de calcium pour éviter une dépolymérisation des billes lors des fermentations successives. La figure 3 montre qu'il y a croissance dans les billes avec une culture non concentrée et ce, dans les 2 milieux mais de façon beaucoup moins importante dans le milieu à haute teneur en extraits de levure, ce qui supporte les observations obtenues avec les cellules libres. La différence entre les populations produites par les 2 milieux est plus importante avec les cellules non concentrées. Les populations provenant de la culture concentrée ont atteint des quantités plus importantes au terme des fermentations successives par rapport aux cellules non concentrées et ce, avec les 2 milieux. Cette observation a donc orienté le procédé vers l'utilisation d'une culture concentrée dans les billes pour sauver du temps de chargement des billes et pour en plus obtenir des populations plus importantes. Cette méthode diminue les risques de contaminations dues à un compte cellulaire peu élevé au début, aux longues fermentations et aux manipulations multiples lors du chargement des billes.

#### -Effet du milieu sur la croissance cellulaire

Il est généralement reconnu que *Propionibacterium* tolère mieux les conditions acides en présence du lactose comme substrat par rapport au lactate. De même, plusieurs auteurs recommandent d'ajouter une source carbonée pour la production d'acides organiques chez *Propionibacterium* (Field et Lichstein, 1957 et 1958; Lewis et Yang, 1992. Lors de la mise au point du milieu de production deux concentrations de lactate (1 et 2 %) et quatre concentrations de glucose (0, 1, 2, 3 %) dans le milieu YE 7% pour un total de 8 milieux en tout furent évalués. Ces milieux furent fermentés en flacons légèrement agités. L'extrait de levure (La3065) utilisé dans la composition du milieu fut fourni par la compagnie Lallemand.

Les populations des billes provenaient d'une culture concentrée 10 fois. Les billes furent d'abord

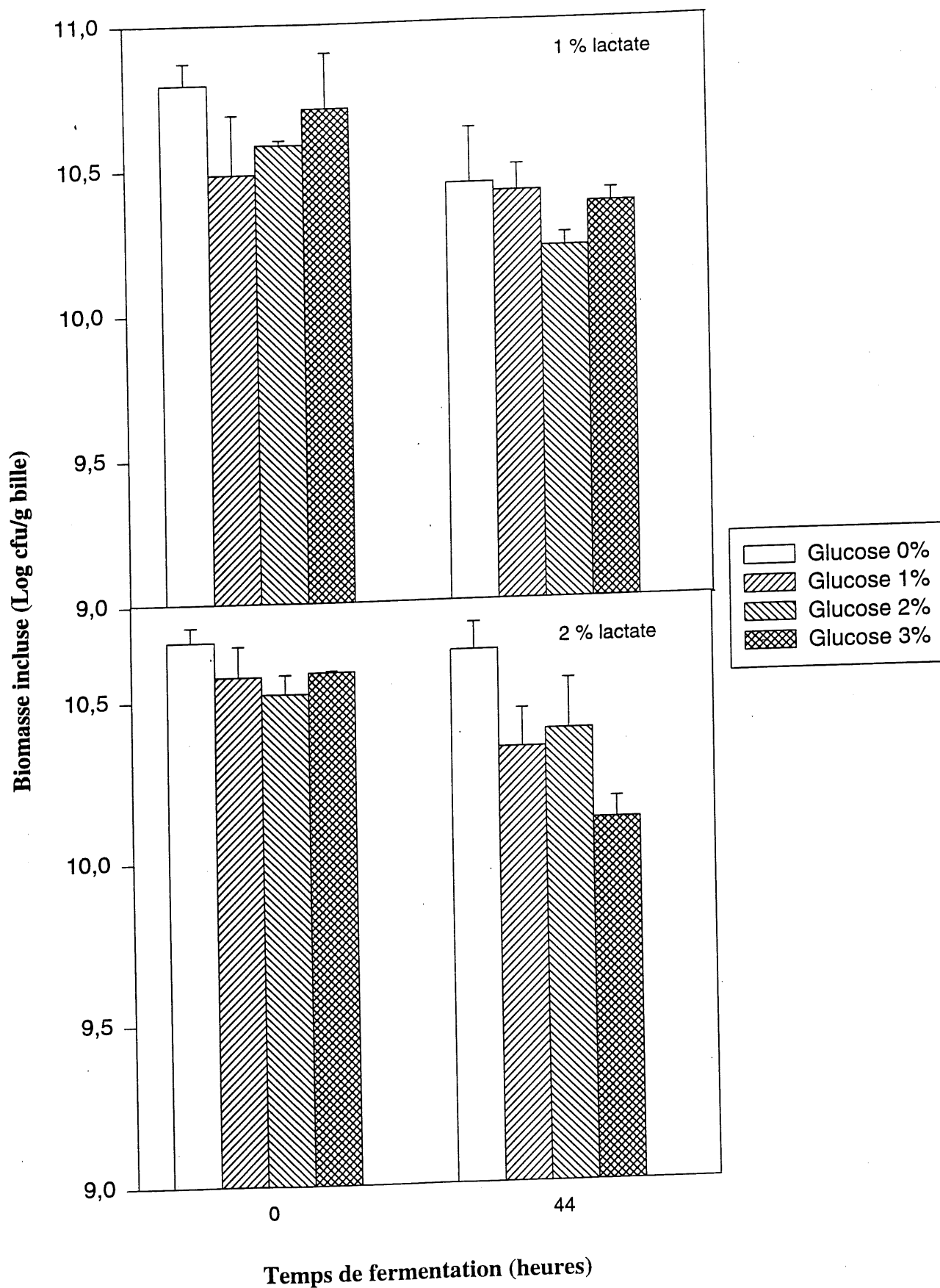
ensemencées à 20% (p/vol) dans les milieux respectifs pour permettre aux cellules de s'acclimater aux conditions de croissance particulières à chaque traitement. La fin de cette première fermentation de 48 h constituait le temps 0.

Le concentré cellulaire avant l'ensemencement dans les milieux était constitué en moyenne de  $3.2 \times 10^{10}$  cfu/g de billes. Un peu de croissance s'est produit lors de la période d'acclimation dans les différents milieux (figure 4) mais de façon générale, une baisse de la population dans les billes au bout de 44 heures de fermentation est observée pour tous les milieux.

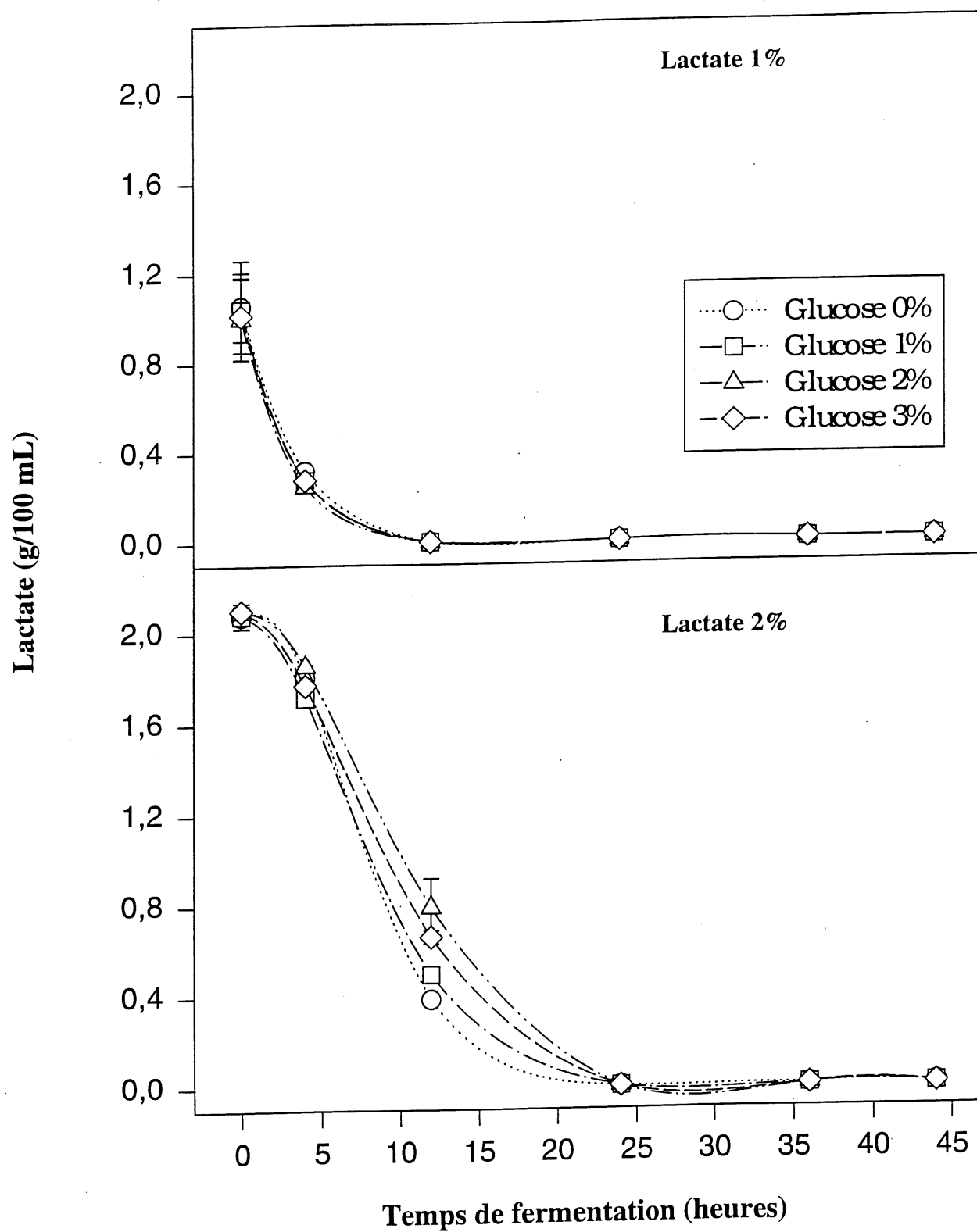
#### -Effet du milieu sur la consommation des substrats

Dans le milieu YE 7% constitué de 1 % de lactate, tout le lactate est métabolisé au bout de 12 heures par la culture immobilisée, peu importe la concentration initiale de glucose (figure 5). Quant au milieu contenant 2% de lactate, ce dernier disparaît complètement au bout de 24 heures seulement. La figure 5 montre que le fait de contenir du glucose diminue légèrement la vitesse d'assimilation du lactate par les bactéries. Dans tous les cas cependant, le lactate est complètement utilisé.

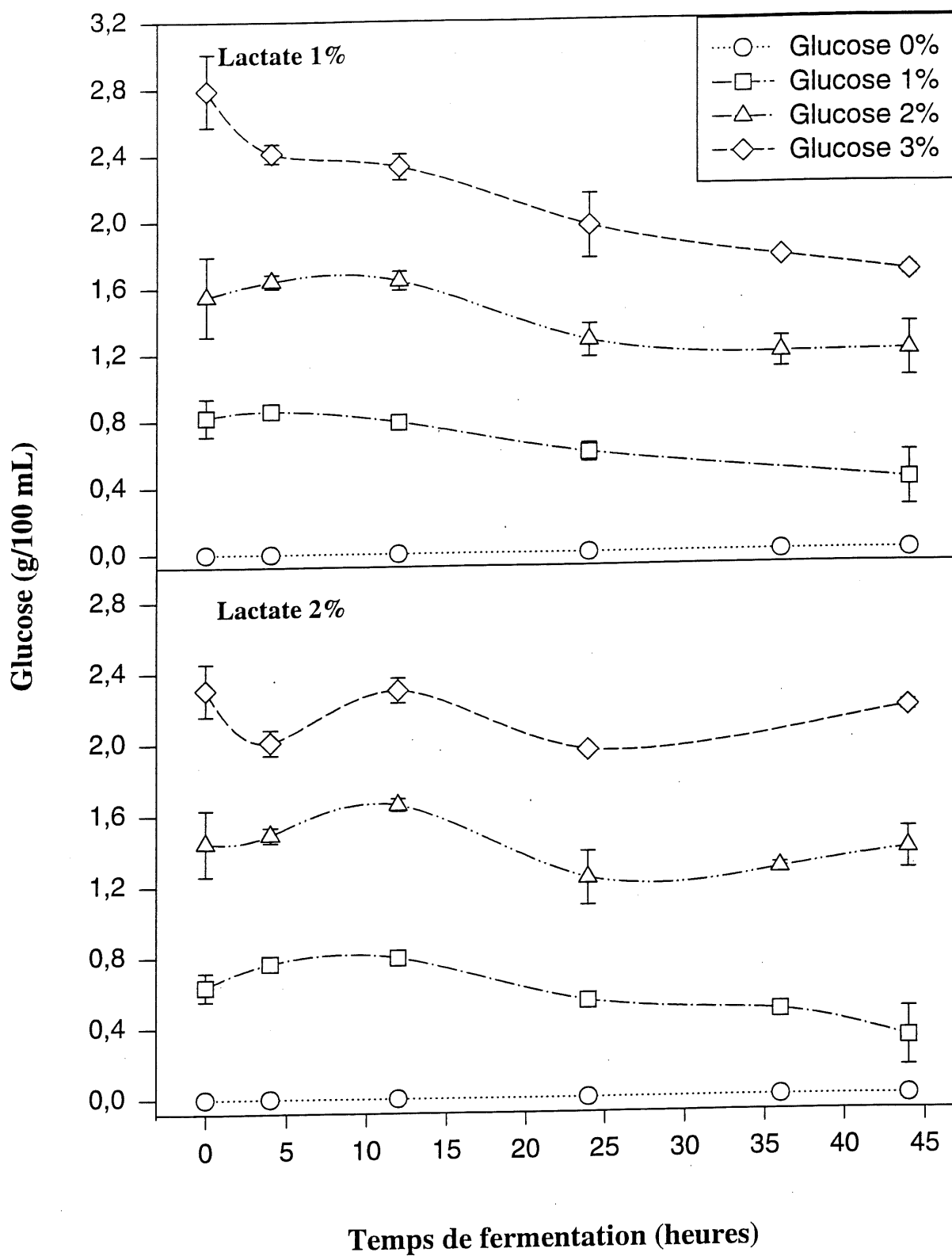
Quant au glucose, il ne montre qu'une baisse légère au bout de 44 heures de fermentation (figure 6). La concentration de glucose est pratiquement demeurée la même dans le milieu contenant 2% de lactate. Dans les milieux ne contenant pas de glucose, le pH ne baisse que très faiblement lors de la fermentation passant de 6.5 à 6.2 après 48 heures. Cependant en ajoutant du glucose aux milieux, il est possible qu'une baisse consécutive de pH limite la consommation du glucose. Contrairement à ce qui a été fait pour les fermentations en flacons, il serait souhaitable de contrôler le pH pour favoriser la consommation complète des substrats. Les concentrations de glucose initiales dosées par HPLC sont plus basses qu'escomptées probablement parce que les échantillons ont été prélevés après l'ajout des billes et que le glucose a eu le temps de diffuser d'une façon plus ou moins importante dans les billes faisant diminuer la concentration par mL de milieu.



**Figure 4. Effet de la concentration de glucose sur la biomasse incluse dans un milieu YE 7% à 1 et 2% de lactate.**



**Figure 5. Consommation du lactate dans les milieux YE à différentes concentrations de glucose**

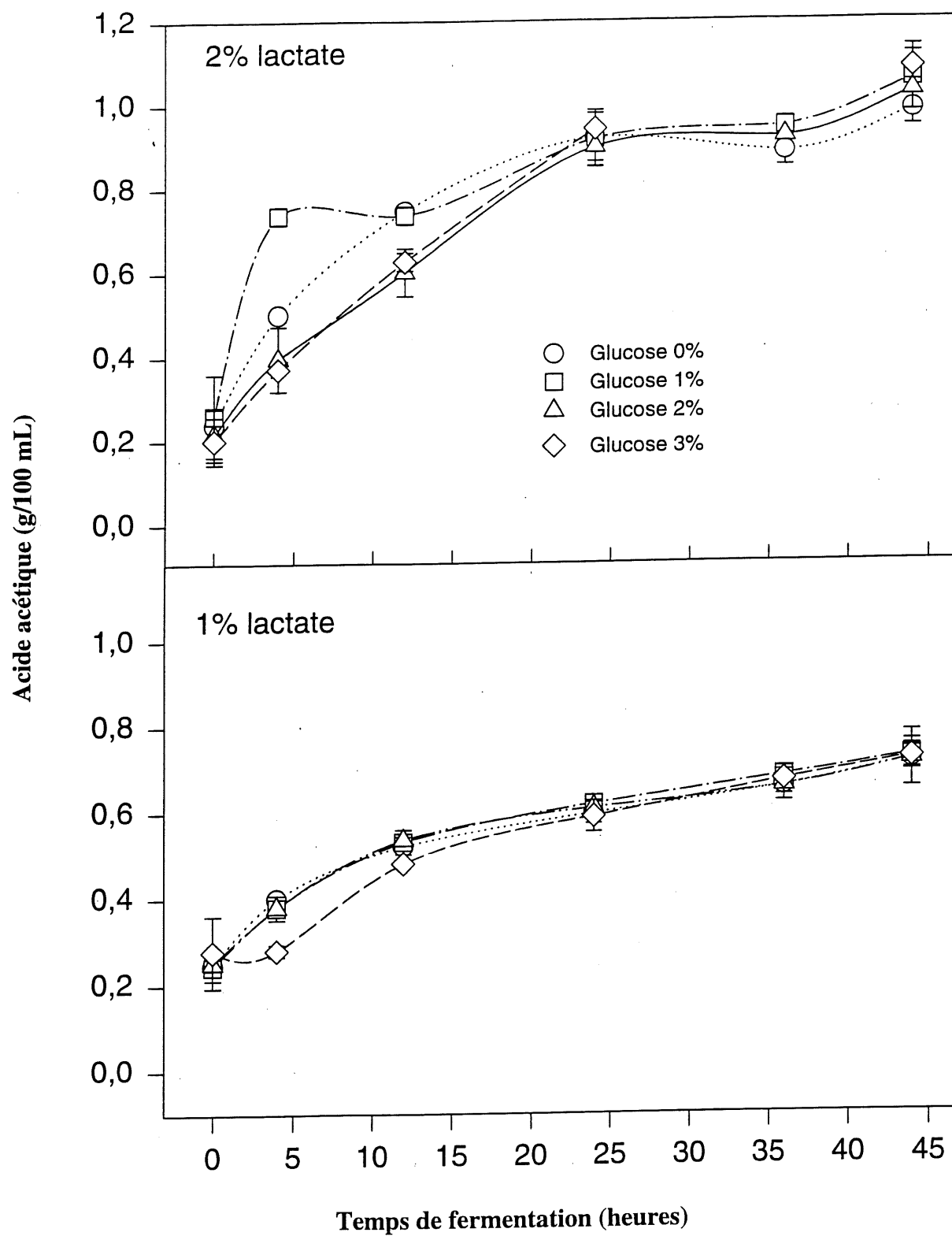


**Figure 6. Consommation du glucose dans les milieux YE**

### -Effet du milieu sur la production des acides organiques

Dans les milieux à 1 et 2% de lactate, indépendamment de la concentration initiale de glucose, la souche a produit en moyenne 0.72 et 1.03 g/100 mL d'acide acétique respectivement (figure 7). Dans le milieu 1% lactate et plus concentré en glucose, la production d'acide acétique fut ralentie au départ pour ensuite rattraper les concentrations atteintes dans les autres milieux. La concentration initiale du lactate a significativement influencé la concentration finale de l'acide acétique ( $P < 0.05$ ), une concentration de 2% donnant 70% de plus d'acide acétique.

La production d'acide propionique fut influencée par la concentration initiale des substrats. Les concentrations finales d'acide propionique étaient en moyenne de 1.9 g/100 mL pour le milieu à 2% de lactate alors que 1.2 g/100 mL fut obtenu pour les milieux contenant 1% de lactate au départ (figure 8). La concentration initiale de l'acide propionique se situait autour de 0.4 g/100 mL au temps 0 probablement dû à l'accumulation de l'acide dans les billes ayant déjà subi une pré-fermentation. Dans le milieu à 2% de lactate, la concentration maximale de produits était obtenue au bout de 24 heures, alors que la production continue faiblement dans le milieu à 1 % de lactate. Dans le milieu à 1% de lactate, tout le lactate fut métabolisé en moins de 15 heures mais la production d'acide propionique augmentait même sans glucose ajouté. Seul le milieu contenant 2% de lactate sans glucose a donné un rendement significativement moins élevé que toutes les autres contenant du glucose ( $P < 0.001$ ). Le milieu YE contenant 2 % de lactate et 1 % de glucose fut donc sélectionné selon les rendements d'acide propionique obtenus. Malgré un métabolisme un peu plus long avec 2% de lactate, la concentration finale d'acide propionique étant d'environ 63% plus élevée pour le milieu lactate 2% démontre que la composition de ce milieu est plus appropriée pour la production des acides organiques avec cette souche. A 2% de lactate, des rendements de 1.1 g d'acide propionique/100 mL de milieu d'acide propionique et de 0.88 g d'acide acétique/100 mL d'acide acétique auraient dû être retrouvés. Des rendements beaucoup plus élevés en acide propionique ont été obtenus, laissant supposer que d'autres substrats ont été utilisés.



**Figure 7. Production d'acide acétique dans le milieu YE 7% à 1% et 2% de lactate.**



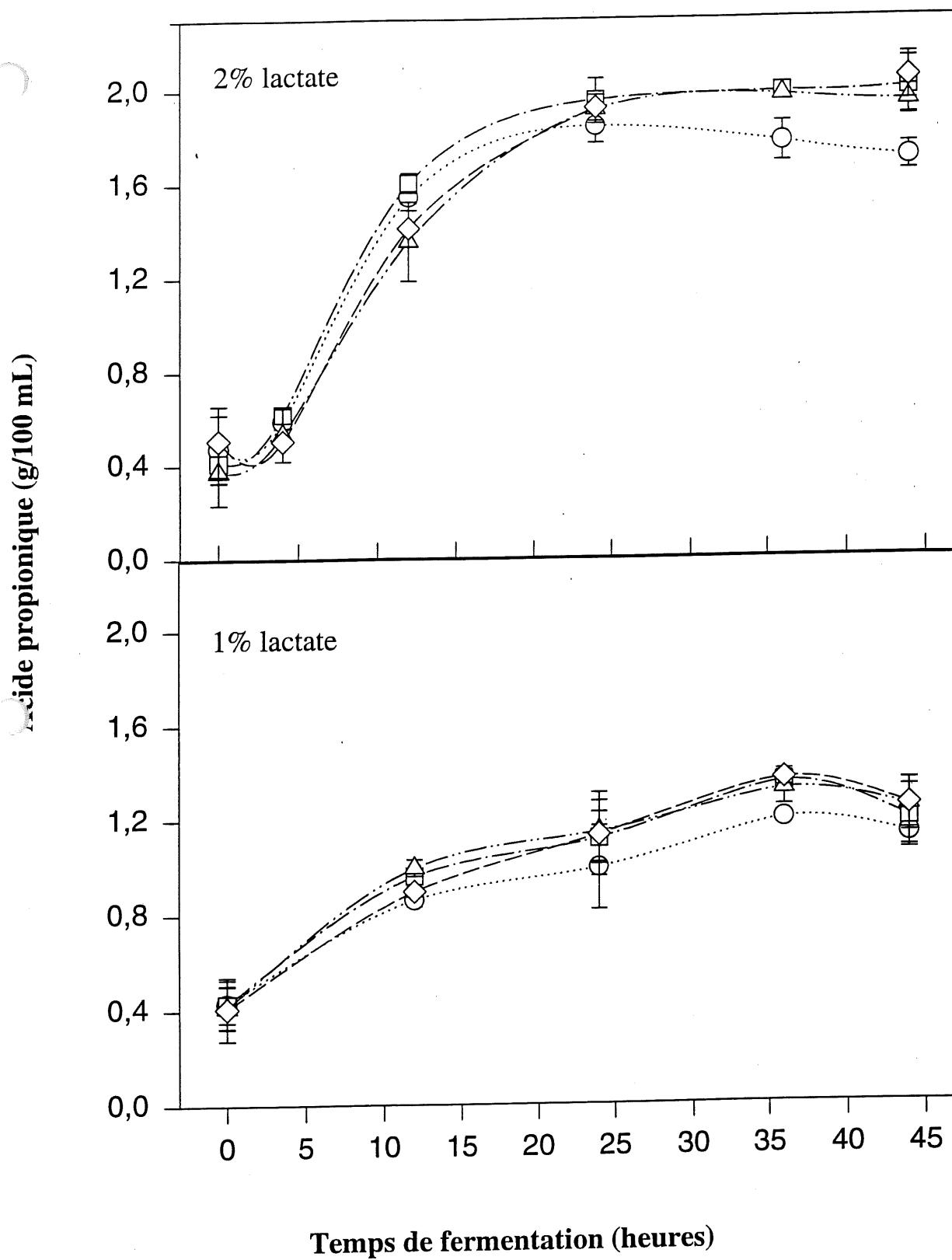


Figure 8. Production d'acide propionique dans le milieu YE 7%

### 3.3 Fermentations successives en bioréacteur

Trois extraits de levure différents furent utilisés dans le but d'en connaître les effets sur la production de biomasse et les rendements. Malgré l'agitation par pals dans le réacteur, les billes se sont bien conservées au cours de fermentations successives. Pour les fermentations en réacteur, les billes ne furent pas acclimatées au milieu de production. Cependant, le milieu LAC qui a servi à produire la biomasse contenait du glucose.

#### -les substrats

Dès la première fermentation, tout le lactate est métabolisé tel que trouvé lors des fermentations en flacons. De fait, après la 1<sup>ère</sup> fermentation, le glucose était encore présent à 0.4 g/100 mL de milieu et ce pour tous les extraits utilisés. Cependant à la 2<sup>ième</sup> fermentation, le glucose ne se retrouvait plus dans le milieu, comme si les cellules avaient induit des mécanismes d'assimilation plus efficaces. Au niveau de la consommation des substrats, les trois extraits ont donné des résultats similaires.

#### -les produits

Le fait de recycler les cellules semblait améliorer la production d'acide acétique tel que démontré par la figure 9. Les concentrations finales étaient cependant similaires pour les 3 extraits de levure, et ce pendant les trois fermentations.

Pour l'acide propionique, le même phénomène fut observé. La concentration finale a augmenté de façon significative avec le recyclage des cellules (figure 9). Au bout de 3 fermentations, l'acide propionique atteint une concentration finale de 2.2 g/100 mL, ce qui est similaire aux concentrations obtenues lors des fermentations en flacon. Au bout de 3 fermentations, la production a augmenté encore un peu. Lors de la première fermentation, l'extrait Oxoid stimulait la production des acides. Les différences diminuaient avec le recyclage des cellules.

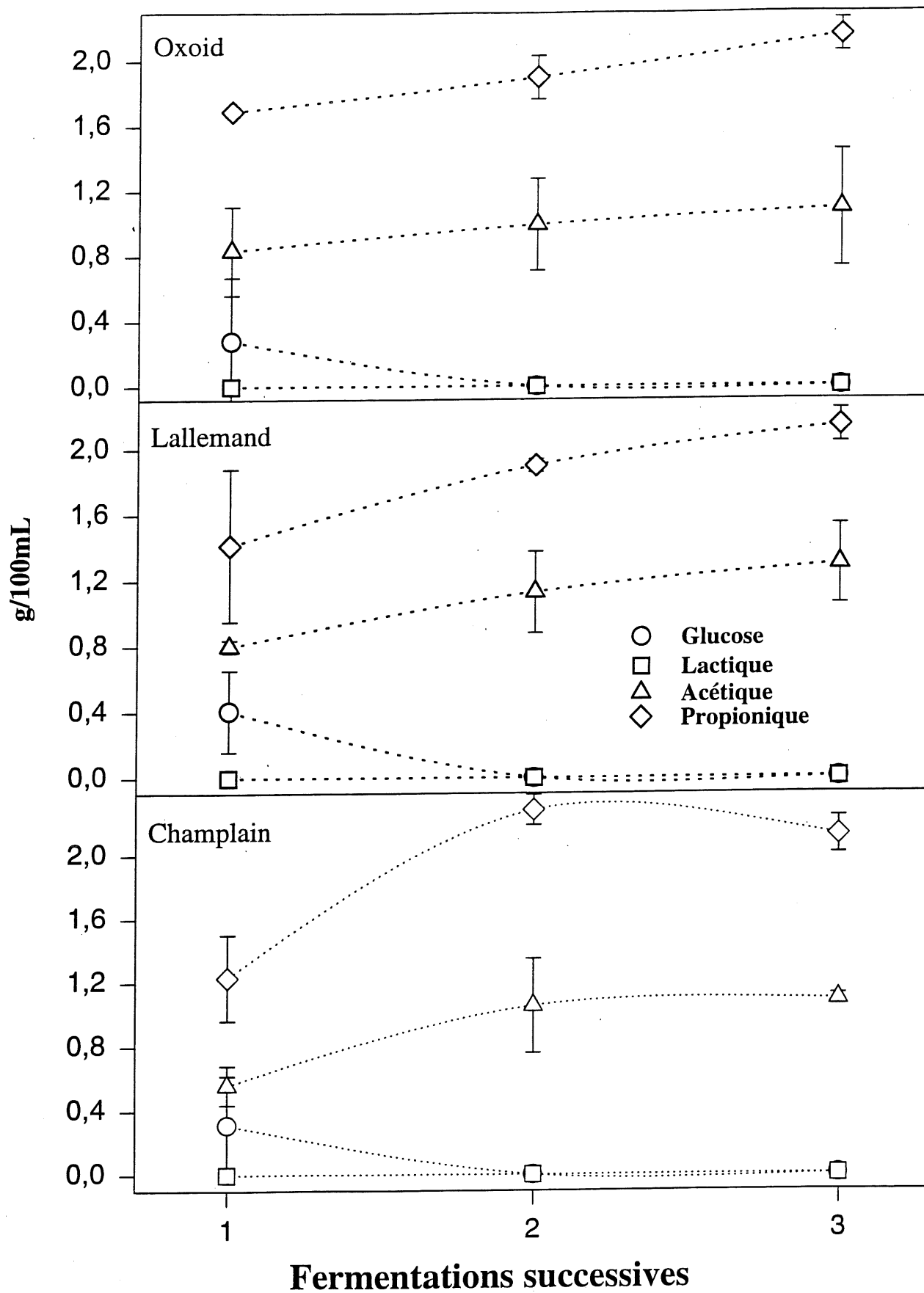


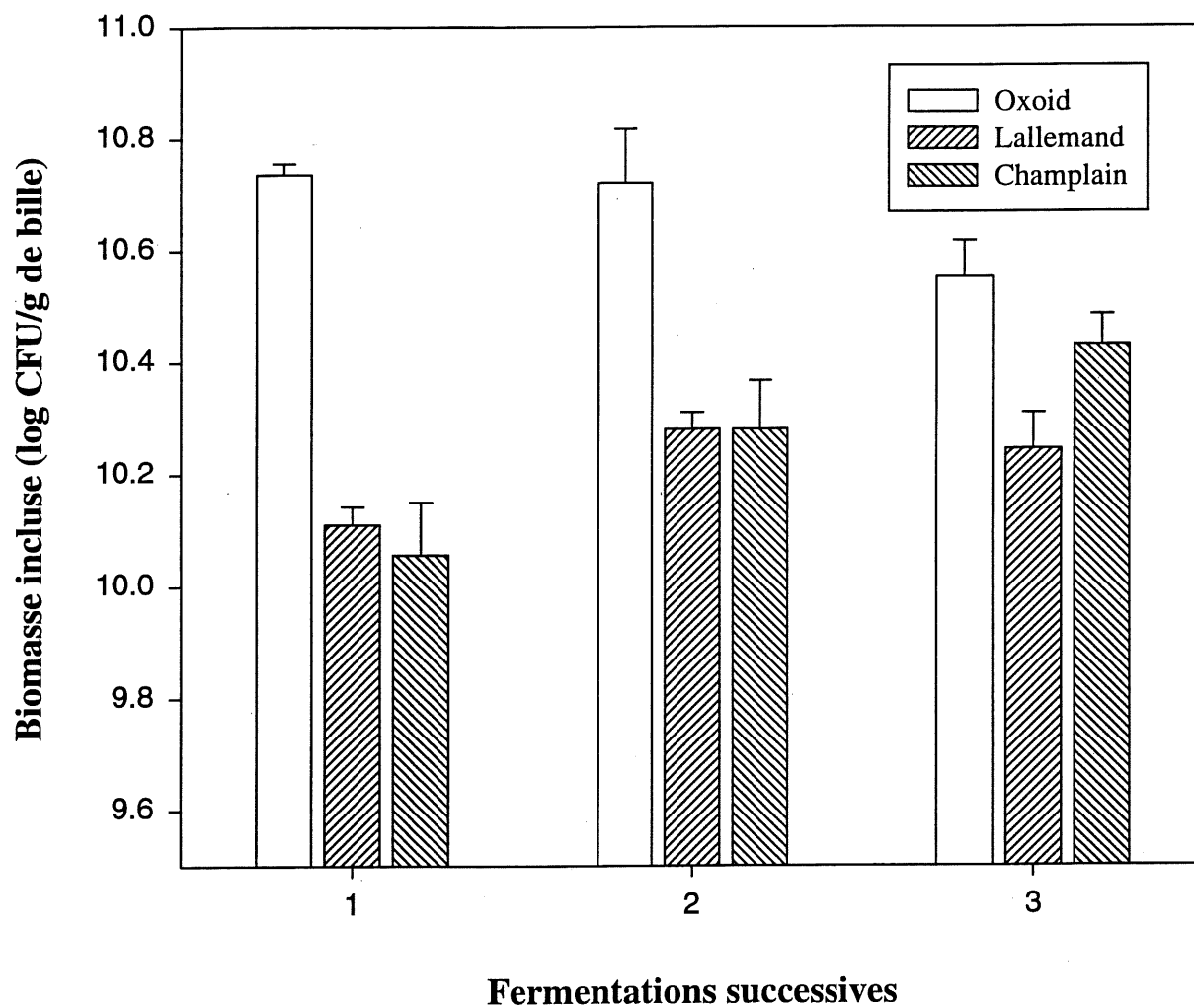
Figure 9. Evolution des composés lors des fermentations successives avec le milieu YE 7 formulé avec 3 extraits différents.

-la biomasse

La population initiale dans les billes avant les fermentations fut évaluée à  $1.37 \times 10^{10}$  CFU/g (soit 10.13 en unité log). Comme le démontre la figure 10, il y a eu de la croissance dans les billes par rapport à la population initiale. Elle demeura stable à  $1.41 \times 10^{10}$  UFC/mL pour les deux fermentations subséquentes, sauf dans les billes utilisées avec l'extrait Champlain, où une augmentation jugée significative ( $P < 0.05$ ) fut notée. La microscopie électronique d'une population de *Propionibacterium* encapsulée et contenue dans milieu Oxoid révèle une matrice loin d'être saturée en cellules (planche 3, photo C). L'espace physique ne semble donc pas être le facteur limitant de la croissance.

### **3.4 Production des poudres**

Chaque milieu de fermentation fut séché par atomisation de façon individuelle. Pour chaque essai donc, 9 poudres furent produites et analysées pour leur contenu en acides organiques. Malgré un procédé qui se déroulait bien et rendait des poudres de bonne qualité, peu de rendement en terme de récupération de poudre fut obtenu. Par exemple pour le milieu Lallemand qui en théorie aurait dû donner environ 30 g de poudre pour 400 mL atomisé (car le milieu contenait 7% d'extrait, 0.5% de calcium, 1% de glucose et des cellules) n'a rendu qu'environ 11 grammes d'extrait fermenté. Les rendements en terme de poudre ont varié selon les séchages (tableau 4).



**Figure 10. Effet de l'extrait de levure utilisé sur la production de biomasse dans le milieu YE lors de fermentations successives**

Tableau 4. Rendements de poudre obtenue pour les extraits fermentés

Poudre produite selon l'extrait et les fermentations	Poids de poudre obtenue (gramme)
Oxoid, fermentation #1	10.9
Lallemand, fermentation #1	11.6
Champlain, fermentation #1	8.7
Oxoid, fermentation #2	15.1
Lallemand, fermentation #2	8.5
Champlain, fermentation #2	15.9
Oxoid, fermentation #3	12.0
Lallemand, fermentation #3	12.0
Champlain, fermentation #3	12.4

Les poudres ne contenaient plus de glucose sauf celles provenant de la première fermentation. L'acide lactique n'a pas été détecté dans les poudres. Beaucoup d'écart a été observé dans les concentrations d'acides propionique et acétique obtenues lors des séchages (figure 11). Dans un milieu contenant environ 10% de solides comme le milieu YE, le séchage a concentré le milieu de 10 fois. Avec des milieux de fermentation contenant autour de 0.8% d'acide acétique et de 2% d'acide propionique, les rendements de ces acides dans les poudres démontraient qu'il n'y a pas eu de perte majeure dû à la volatilisation lors du séchage (figure 11).

Etant donné que les poudres provenant de la première fermentation contenaient du glucose, elles n'ont pas été utilisées avec les poudres issues des 2 et 3 ième fermentations. Malgré les différentes compositions, les autres poudres ont été utilisées de la même façon dans les fermentations panaires. Ces dernières furent mélangées selon les extraits et les essais.

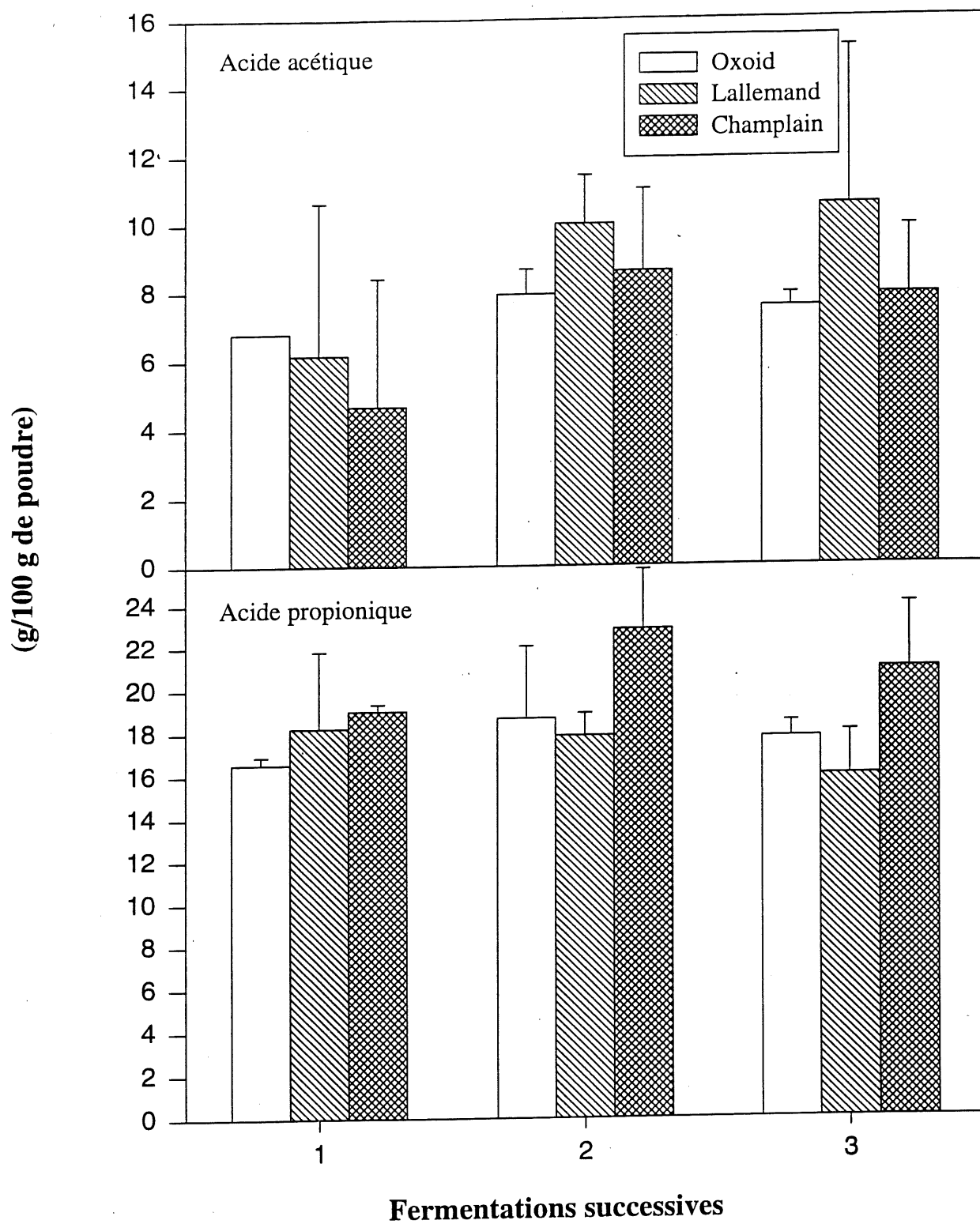


Figure 11. Contenu en acide acétique et propionique des poudres fermentées

## 4 CONCLUSION

Une meilleure biomasse a été obtenue avec le milieu lactate qu'avec le milieu YE 7%. Cependant une excellente production d'acide propionique a eu lieu dans le milieu YE 7%. Le glucose à 1% a amélioré les rendements en acide propionique sans toutefois augmenter la production d'acide acétique.

Il n'y a pas eu de croissance importante dans les billes lorsque les cellules de départ étaient concentrées. Les propionibactéries montrent donc un découplage entre la croissance et la production de métabolites et ce tout au long de la fermentation. Étant donné que l'espace physique ne semble pas limitant, il est légitime de soupçonner le fait que la souche est un anaérobe stricte soit responsable de l'absence de croissance. L'encapsulation diminue les transferts d'oxygène mais surtout vers le centre de la bille. Lors de la mise au point des méthodes de dénombrement, il a été démontré que la présence d'oxygène même sous tension réduite (jarre chandelle) empêchait la croissance de la souche de *Propionibacterium* utilisée pour cette étude. Lors des fermentations préliminaires en flacons avec des cellules libres, les cultures n'étaient pas agitées pour maintenir des conditions réduites en oxygène. Dans ces conditions, il y a eu croissance cellulaire. En billes cependant, les flacons ou les réacteurs ont été légèrement agités (60 à 100 rpm) pour maintenir les billes en suspension et éviter les gradients de substrats, de pH et de métabolites. L'agitation a possiblement introduit de l'oxygène limitant la croissance mais pas assez pour être toxique et empêcher le métabolisme cellulaire. Cependant, les résultats obtenus avec les cellules non concentrées sous les mêmes conditions expérimentales ne corroborent pas cette hypothèse (figure 3) car il y a eu croissance dans les billes lors de la 1ère fermentation avec les cellules non concentrées. Chez les bactéries lactiques, ce phénomène de découplage entre la croissance et la production d'acide est généralement dû à une baisse de pH. Étant donné que le pH était contrôlé dans les bioréacteurs, la croissance a pu être ralentie par l'épuisement des substrats. Ainsi, la figure 10 montre qu'il y a eu croissance dans les billes lors de la 1ère fermentation alors qu'un peu moins de 0,4 g/100 mL de glucose est encore disponible aux cellules. Lors des fermentations suivantes, tous les substrats sont métabolisés, limitant la croissance de la biomasse, compromettant même la survie des cellules encapsulées.



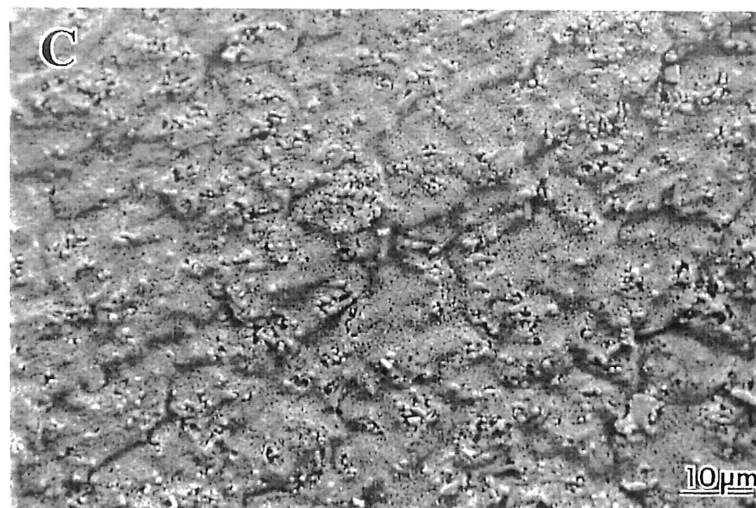
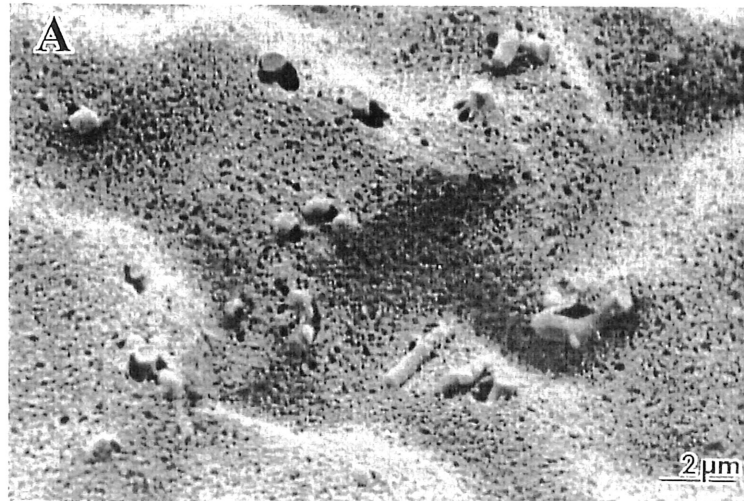


Planche 3. Microscopie en balayage de *Propionibacterium* immobilisé dans une matrice d'alginate.

Bégin *et al.* (1992) ont observé que le lactose n'était pas complètement métabolisé lors de la 1ère fermentation expliquant l'augmentation des rendements en acides propionique et acétique au cours des fermentations suivantes. Étant donné le fait que le lactate est disponible et à proximité des cellules colonisant la surface de la matrice, ces cellules utilisent préférentiellement le lactate laissant les sucres encore disponibles aux cellules internes. Le fait d'être à la surface de la bille confère un avantage certain sur la population interne de la bille. Les substrats sont directement disponibles et les produits immédiatement dilués dans l'environnement. La disparition totale du lactate en moins de 24 heures est probablement attribuable aux cellules de surface. Les cellules internes doivent subir un délai pour croître plus ou moins prolongé selon la vitesse de diffusion des produits vers le centre de la bille. De plus, ces cellules risquent d'être exposées plus longtemps aux métabolites produits. L'utilisation des sucres à l'intérieur de la bille laisse donc supposer une baisse de pH et donc la formation d'un gradient de pH du centre vers l'extérieur de la bille. Contrairement aux résultats obtenus lors de la présente étude, Cavin *et al.* (1985) ont observé une augmentation de 10 fois des microorganismes dans les billes lors de l'adaptation de la biomasse au système en continu. Dans des conditions plus semblables aux nôtres, lors d'usages répétés de *P. acidipropionici* immobilisé dans de l'alginate, Glatz et Paik (1994) ont noté une baisse du nombre de cellules viables dans les billes.

Neronova *et al.* (1967) ont relié le faible taux de croissance de *P. shermanii* avec l'accumulation des acides dans le milieu. Ils ont mis en évidence l'effet nocif du propionate sur la croissance par rapport à l'acétate. Il est possible donc que les cellules ne se reproduisent pas dû à l'accumulation des acides organiques dans la bille, augmentant avec les fermentations répétées.

Les rendements augmentent avec le recyclage des cellules. Bégin *et al.* (1992) ont noté que l'activité fermentaire des cellules augmentait avec les usages, se stabilisant au bout de la 3ième fermentation. Les rendements dépassent de peu les rendements théoriques. Il peut s'agir d'une accumulation des acides dans les billes provenant de la fermentation précédente qui s'additionne à la production de la fermentation en cours. Considérant que la biomasse constitue 20% du milieu et qu'elle est complètement saturée en acide propionique, (c'est-à-dire l'intérieur de la bille) une concentration finale d'environ 1.92 g/100 mL de milieu aurait dû se retrouver à la fin de la 2ième fermentation. Une

concentration un peu plus élevée de 2.2 g/100mL fut observée à la fin des fermentations. Pour s'assurer qu'il ne s'agit d'un phénomène d'accumulation, il aurait fallu laisser tremper les billes dans une solution neutre de rinçage pour éliminer les traces de milieu des fermentations précédentes. Des travaux antérieurs ont montré qu'un temps de trempage de 30 min. était nécessaire pour libérer les métabolites encapsulés (résultats non publiés).

Les rendements étant très acceptables, la biomasse semble donc accessoire dans le cas présent. Il faudrait cependant vérifier combien de temps et pour combien de fermentations les cellules tiendraient le coup. Une atmosphère d'azote dans le réacteur pourrait possiblement améliorer le procédé et permettre l'utilisation de la biomasse à plus long terme. De plus, l'utilisation du lactate plutôt que du lactose ou glucose est préférable car la production des acides acétique et propionique à partir d'un hydrate de carbone diminue le pH du réacteur alors qu'avec le lactate, le pH varie peu. Pour éviter de contrôler le pH et ainsi simplifier le procédé, les sucres peuvent être omis. Tel que recommandé par Cavin *et al.* (1985), les sucres ne devraient pas être utilisés comme substrat lorsque des fermentations répétées sont prévues afin d'éviter un gradient de produits et de pH dans la bille. Il a été démontré que lorsque le lactose était utilisé comme substrat, la densité cellulaire finale était plus importante qu'avec le lactate. Les temps de fermentation sont cependant similaires indépendamment des substrats, ce qui suppose qu'une propionibactérie fermente plus rapidement le lactate que le lactose (Lewis et Yang, 1994).

De plus, Paik et Glatz (1994) ont démontré que la production d'acide propionique était diminuée lorsque plus de 18 mM de  $\text{CaCl}_2$  était utilisé dans le milieu avec *P. acidipropionici*. Nous avons utilisé presque le double de la concentration recommandée. Chez *P. shermanii*, Jain *et al.* (1991) ont démontré que le  $\text{CaCO}_3$  ajouté au milieu avait un effet bénéfique prononcé sur les rendements en acide propionique à cause du pouvoir tampon accru dû à sa présence et du complexe calcium de propionate qui est moins inhibiteur chez *Propionibacterium* que la forme libre de l'acide. Champagne *et al.* (1989) ont également remarqué que le  $\text{Ca(OH)}_2$  favorisait l'activité fermentaire lorsqu'utilisé comme agent neutralisant par rapport au NaOH. L'effet du calcium aurait avantage à être investigué pour la production d'acide avec *P. shermanii* surtout si un contrôle externe de pH est utilisé.

Le procédé pourrait possiblement être amélioré si des fermentations en continu étaient utilisées comme Boyaval et Corre (1987) l'ont démontré à partir d'un perméat de lactosérum. Ils ont combiné une fermentation en continu avec le recyclage des cellules par ultrafiltration. Cavin *et al.* (1985) ont utilisé la même biomasse pendant 60 jours en observant une activité métabolique plus grande lorsque les cellules furent utilisées en continu plutôt qu'en lot (batch). Cependant dans les fermentations en continu, les concentrations finales de produits retrouvés dans l'effluent sont souvent faibles, augmentant les coûts associés à la séparation et purification des composés d'intérêts. L'utilisation des cellules immobilisées dans un système alimenté de substrats à interval réguliers (fed batch) permet d'obtenir une haute productivité (grâce aux cellules immobilisées) et une concentration finale élevée de produits. Ce procédé est probablement celui qui serait le mieux adapté à la production d'acide propionique.

Les rendements en acide propionique ont été plus influencés par le fait de recycler les billes que par la nature de l'extrait proprement dit. A la première fermentation, l'extrait Oxoid a contribué à une plus grande production d'acides acétique et propionique que les autres. Au cours des fermentations suivantes, cette tendance disparaît.

Colombian *et al.* (1993) ont utilisé des sources d'azote variées dans un réacteur en continu. Les extraits de levure ont donné des rendements supérieurs en acide propionique comparé aux levures désactivées, autolysées, aux extraits de poissons, aux hydrolysats de blé et de maïs et aux protéines de lactosérum. En plus, des extraits testés, c'est le LS65 de Lallemand (le même extrait que dans la présente étude) qui a le mieux performé en terme de production d'acide propionique. Dans les systèmes en continu qui utilisent l'ultrafiltration, les mannanes (provenant des écorces de levures) ont tendance à former un film bloquant les membranes du système de filtration. Avec le LS65, ce problème technique fut moins prononcé.

Contrairement à ce qui a été trouvé dans les années 50 par Field et Lichstein (1957; 1958), Anderson *et al.* (1986) ont démontré que la croissance et la production d'acide propionique par *P. shermanii* étaient inhibées par un lactosérum stérilisé particulièrement à des concentrations de solides

supérieures à 2%. Ils ont compensé cette inhibition en augmentant la concentration en extraits de levure. Du procédé de stérilisation à haute température du lactosérum surviennent des réactions de Maillard, réactions entre la portion aminée libre des protéines et le groupe aldéhyde du lactose résultant en la diminution de la valeur nutritive du milieu. Bodie *et al.* (1987) ont démontré qu'une stérilisation à ultra-haute température permettait d'obtenir de meilleurs rendements en acide propionique et qu'un milieu contenant jusqu'à 18% de solides pouvait être utilisé. L'effet du traitement thermique du milieu sur la production d'acide propionique aurait tout avantage à être investigué.

## **CHAPITRE III**

### **EFFET ANTIFONGIQUE ET BIOSTIMULANT DES EXTRAITS DE LEVURE RICHES EN ACIDE PROPIONIQUE**

#### **1. INTRODUCTION**

A la sortie du four, la température de la surface du pain se situe autour de 180°C et est libre de toute contamination, la cuisson ayant détruit les microorganismes présents. Durant la période de refroidissement, le pain se recontamine généralement avec des spores de moisissures provenant de l'atmosphère.

L'acide propionique est un agent de conservation largement utilisé en panification. Il a été démontré qu'il existe une synergie entre les acides organiques comme agents antimicrobiens (Adams et Hall, 1988; Bibek et Daeshel, 1985). Etant donné que l'extrait de levure contient également de l'acide acétique, il augmente le potentiel antifongique de l'extrait de levure fermenté.

Le fait d'ajouter de l'extrait de levure dans les pains aura possiblement une incidence sur la panification, la texture et le goût du pain. Récemment il y a un intérêt grandissant pour les produits de boulangerie ayant un goût et une couleur prononcés ce qui a amené l'utilisation d'ingrédients tels le

lait fermenté par des bactéries lactiques variées (Gélinas *et al.*, 1992). L'ajout de l'extrait de levure, s'il s'avère attrayant pour le procédé de panification, aurait avantage à être essayé dans les pains de spécialité ou les pâtes de céréales plus complètes. Dans l'étude actuelle, les extraits ont été ajoutés à une recette de pâte classique afin de déceler facilement les effets de l'ajout. Le but principal demeure cependant une augmentation de la durée de conservation des pains et une biostimulation de la levure en fermentation panaire par l'extrait de levure.

## **2 MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **2.1 Production de suspensions de spores**

Les souches de moisissures sélectionnées furent fournies par la compagnie Culinar, Montréal. À partir de Pétri contenant le mycélium, une loupe de moisissures de chaque souche fut striée sur une autre boîte de Pétri contenant un milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Difco). Les boîtes furent incubées à 30°C pendant 14 jours pour permettre la sporulation. Une solution de peptone (1% p/v) et de glycérol (20% v/v) fut déposée sur les spores (6 mL par boîte) et les spores furent récoltées avec une tige de verre et congelées à -70°C. Après 48 heures, la suspension fut de nouveau dénombrée sur PDA.

### **2.2 Production des pains**

Pour la fabrication des pains, les ingrédients secs furent mélangés 15 secondes dans un pétrin Hobart, modèle C-100, dont 400 g de farine Robin Hood, 12 g sucre, 8 g de sel, 12 g de graisse végétale, 12 g de levure humide, 8 g de gluten, et lorsqu'applicable 4 g d'extrait de levure fermenté ou non. L'eau (225 g) et 1160 ppm d'acide ascorbique (base de poids/farine) furent ajoutés aux solides et pétris jusqu'à l'obtention d'une pâte élastique homogène se déployant mince comme un papier de soie sans se briser (5 à 7 min de pétrissage). Un temps de repos de 30 min sous un linge humide à la température pièce fut alloué à la pâte. La pâte fut ensuite séparée en 2 boules de 345 g et façonnée dans un laminoir avant de passer à l'étuve contrôlée à 35°C et 82% d'humidité. Le temps de levée du pain était déterminé en fonction du volume atteint par la pâte et mesuré selon la hauteur de la pâte au-dessus des rebords

du moule. Les pains furent ensuite cuits dans un four à convection pendant 12 min. à 415°F et refroidis sur une grille pendant 1 heure pour ensuite être pesés, tranchés, emballés et congelés à -20°C. Les pains furent analysés pour leur contenu en acides organiques et en sucres. Pour ce faire, 10 g de mie furent homogénéisés dans 100 mL d'éluant du HPLC, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.008N. Les échantillons furent centrifugés (3000 X g pendant 20 min.) et filtrés sur une membrane de 0.45µm (filtres HVLP, Millipore). Ils furent ensuite injectés sur une colonne Aminex (HPX 87H) tel que décrit au chapitre précédent. Sur les figures, les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur la moyenne.

Tableau 1. Bloc expérimental des fabrications de pains.

1	2	3	4	5	6	7	8
TEM1	PCH2	PCH1	LS1	PROP4	LS3	POX1	OX3
PLS1	CH1	PROP1	TEM2	PCH2	PROP4	TEM4	OX4
PLS2	POX2	CH2	PROP2	PCH1	LS4	PLS2	CH3
OX1	OX2	POX1	LS2	TEM3	PLS2	POX2	CH4

1. TEM: pain témoin fabriqué sans extrait, sans acide
2. PROP: pain témoin additionné de 2000 ppm d'acide propionique
3. OX: pain fabriqué avec l'extrait Oxoid non fermenté
4. POX: pain fabriqué avec l'extrait Oxoid fermenté par *Propionibacterium*
5. LS: pain fabriqué avec l'extrait Lallemand non fermenté
6. PLS: pain fabriqué avec l'extrait Lallemand fermenté par *Propionibacterium*
7. CH: pain fabriqué avec l'extrait Champlain non fermenté
8. PCH: pain fabriqué avec l'extrait Champlain fermenté par *Propionibacterium*



## 2.3 Ensemencement des pains avec les moisissures

Les pains furent décongelés la veille de l'expérimentation. Les bases des pains furent tranchées de façon à entrer dans une barquette et que la partie supérieure ne touche pas à l'emballage. Les inocula de spores décongelés furent dilués dans la peptone de 0.1% de façon à obtenir  $10^5$  spores/mL. Deux gouttes de 10  $\mu$ L furent déposées à la surface des pains pour chaque souche de moisissure. Les pains furent emballés et placés dans une chambre à 20°C. La croissance des moisissures fut observée chaque jour en mesurant le diamètre des mycélia sans ouvrir les sacs. Les *Penicillium* étaient aisément différenciés des *Rhizopus* par leur couleur verte alors que ces derniers présentent des spores noires.

## 2.4 Effet biostimulant des extraits sur la levure

### 2.4.1-En panification

Des pâtes à pain furent fabriquées telles que décrites précédemment pour vérifier l'effet stimulant de l'extrait sur la levure en panification. Les traitements étudiés sont les mêmes que pour l'effet antifongique des extraits (tableau 1). Les pâtes furent séparées en portions de 50 grammes et déposées dans des contenants de verre dans un bain thermostaté à 37°C. La formation de gaz par la levure fut suivie sur une période de 90 minutes par l'appareil Rhisograph (Oregon, USA) couplé à un ordinateur pour l'acquisition des données. Six contenants par traitement furent démarrés en même temps et 2 essais par extrait ont été exécutés.

Après la cuisson, les pains furent pesés et leur volume mesurés par déplacement de graines de colza pour ensuite être tranchés sur un tranchoir mécanique. Deux tranches provenant de la partie du milieu de chaque pain furent prélevées et numérisées à l'aide d'un scanner HP Deskscan et des logiciels Photoshop 3.0 et Sigma scan Pro 2.0. L'analyse a permis de mesurer la surface totale des trous, leur nombre, leur diamètre moyen et leur rondeur, le chiffre 1 représentant un trou parfaitement rond et le 0 une ouverture en ellipse. Pour illustrer la variabilité, des barres d'erreur identifiant l'erreur standard sur la moyenne sont présentées sur les figures.

#### 2.4.2 -En production de biomasse de *Saccharomyces cerevisiae*

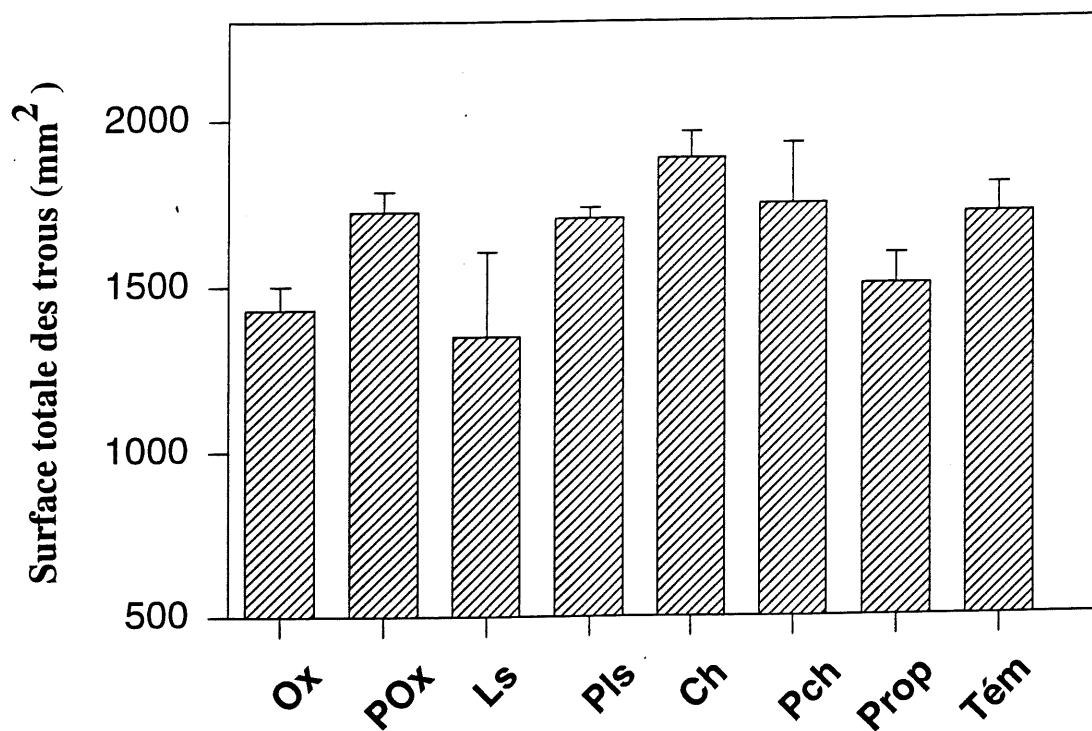
A partir de levure humide commerciale utilisée en panification, une colonie fut isolée et servit de culture-mère pour les essais en laboratoire. La souche de *Saccharomyces cerevisiae* fut produite et maintenue sur milieu YM (Difco) à 37°C pendant 24 à 48 heures. La souche fut repiquée à tous les 4 jours. Sauf dans les essais préliminaires, le milieu de base utilisé était composé de 1% glucose, 0.2% d'extrait de malt et de 0.05% d'extrait de levure provenant des fermentations. Pour les essais préliminaires, la concentration d'extrait de levure a varié de 0.05 % à 0.15% (p/vol), le but étant d'obtenir une bonne croissance des levures sans toutefois dépasser la portion linéaire de la courbe de densité optique. Le milieu fut stérilisé à 121°C pendant 15 min. Les milieux furent ensemencés avec 1.0% de levure produite sur milieu YM et distribués en portion de 250 µL dans les puits de plaque de Bioscreen. Cinq puits par traitement furent ensemencés. Deux témoins ne contenant aucun extraits de levure furent également ajoutés, l'un deux fut ensemencé avec la levure tandis que l'autre stérile constitua le blanc. Le milieu fut maintenu à 37°C et une lecture de la densité optique à 600 nm aux 10 minutes fut effectuée suite à une agitation moyenne de 1 minute sur une période de 24 heures.

### 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

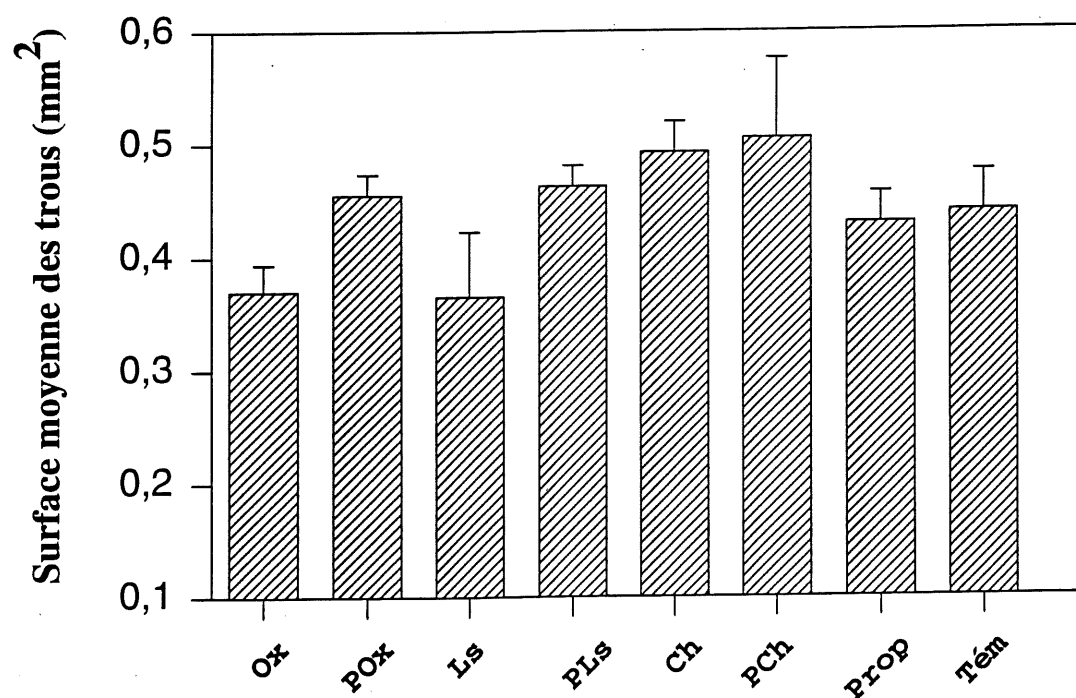
#### 3.1 Effet de l'addition des extraits sur les pains

L'analyse d'image a démontré que l'addition des extraits de levure n'a pas d'effet significatif sur la surface totale des trous de la mie. Les extraits fermentés n'ont pas influencé la surface totale des trous, ni leur surface moyenne (figures 1 et 2). Les pains sans extrait ajouté mais additionnés d'acide propionique ressemblaient aux témoins.

De façon générale les pains contenant des extraits fermentés étaient plus volumineux que ceux contenant des extraits non fermentés; l'exception provenant de l'extrait Champlain (tableau 2). Cependant ces différences ne sont pas significatives ( $P > 0.05$ ). L'analyse statistique (Chi test) a démontré une interaction significative entre les volumes des pains avec les surfaces totales des trous.



**Figure 1. Surface totale des trous dans les pains selon les ingrédients utilisés**

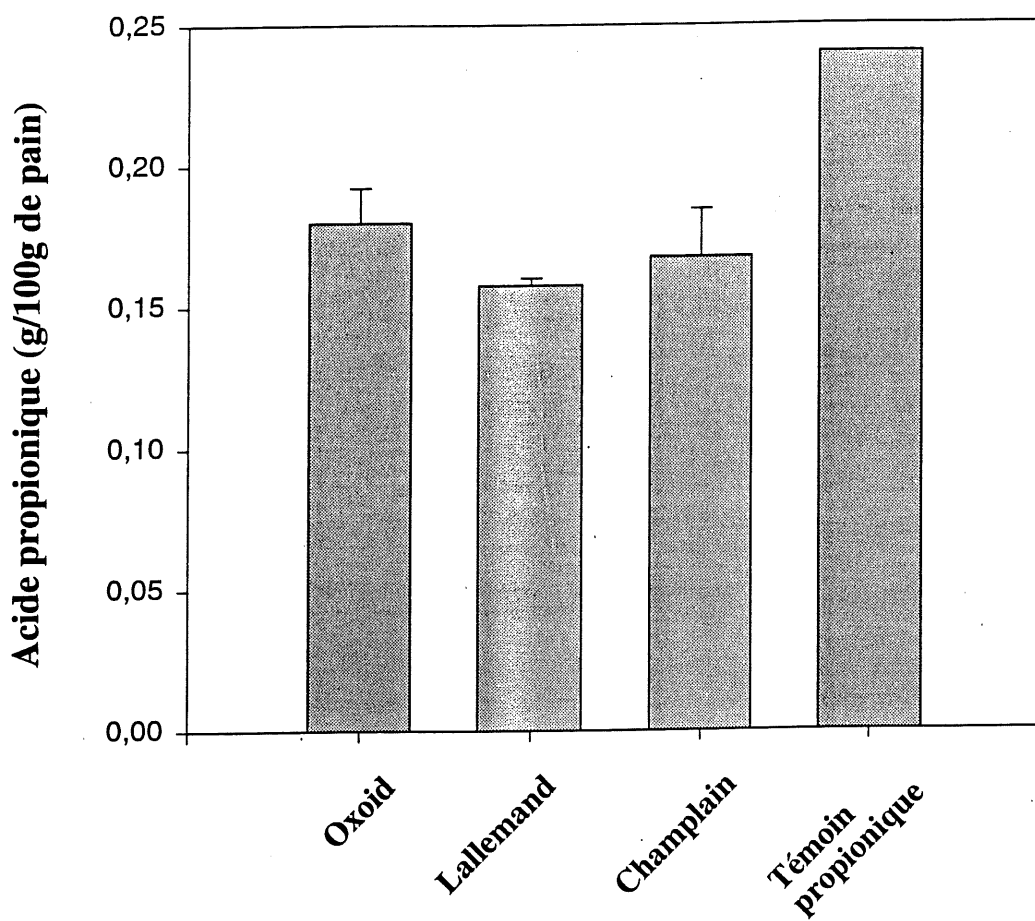


**Figure 2. Surface moyenne des trous selon les ingrédients utilisés**

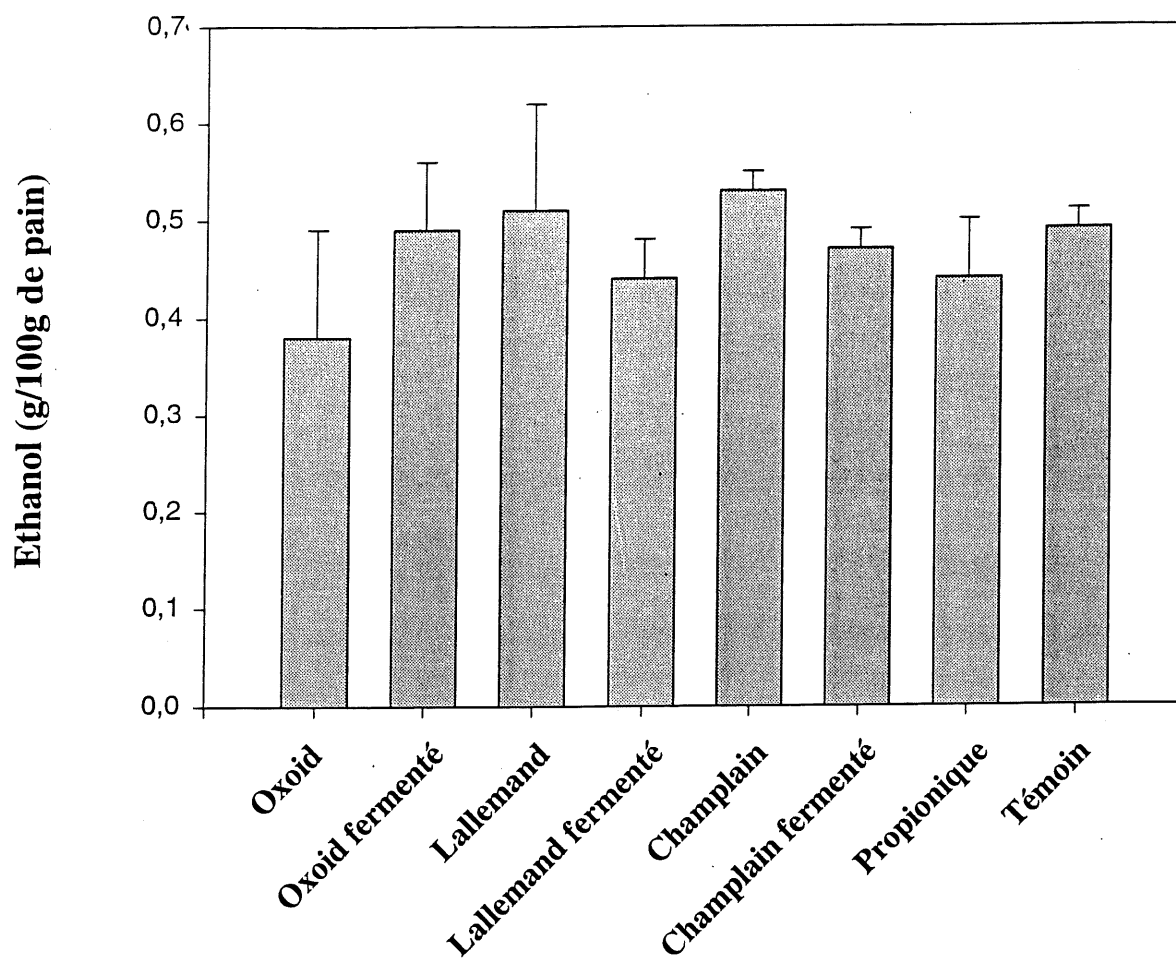
Tableau 2. Effet de l'addition de l'extrait de levure sur les volumes du pain

Traitement	Volume du pain (cc)	Ecart type
Témoin	1575	47
Oxoid	1508	49
Oxoid fermenté	1607	109
Lallemand	1500	70
Lallemand fermenté	1538	46
Champlain	1531	69
Champlain fermenté	1460	109
Témoin propionique	1560	36

Les pains contenaient tous une concentration importante d'acide propionique, les concentrations variant de 0.15 à 0.23 g d'acide propionique par 100 g de pain (figure 3). Cependant le témoin propionique était celui qui en contenait le plus et le pain fabriqué avec un extrait fermenté Lallemand le moins. Il est normal d'observer moins d'acide propionique avec cet extrait car c'est celui qui en contenait le moins au départ dans la poudre. Il a été décidé de ne pas corriger pour la différence en concentration d'acide propionique dans les poudres. Les pâtes témoin propionique contenaient environ 600 ppm de plus que les pains expérimentaux fabriqués avec les extraits fermentés. La norme maximale américaine étant de 2000 ppm, les pains témoins de propionique ne seraient pas conformes car ils contenaient au total 2300 ppm d'acide propionique. Les pains contenant des extraits non fermentés ne contenaient pas d'acide propionique. Cependant tous contenaient de l'éthanol (figure 4). De façon générale, les pains contenaient des concentrations en éthanol semblables au témoin sauf pour l'extrait Oxoid non fermenté qui en contenait moins mais les écarts étant grands, les différences n'étaient pas significatives.



**Figure 3. Acide propionique contenu dans les pains additionnés d'extraits de levure fermentés**



**Figure 4. Ethanol contenu dans les pains additionnés d'extraits de levure**

### 3.2 Effet antifongique des extraits sur les pains

La présence des moisissures à la surface des pains ne fut perceptible qu'après 5 jours d'incubation (tableau 3). Les pains contenant de l'acide propionique n'en montrèrent qu'après 16 jours d'incubation et seul le *Rhizopus* a poussé. Dans tous les cas, les pains contenant les extraits fermentés ont été protégés significativement plus longtemps contre les moisissures que ceux contenant les extraits non fermentés ( $P \geq 0.05$ ). Par exemple, les pains fabriqués avec l'extrait Oxoid non fermenté ont montré des signes de contaminations au bout de 8.5 jours en moyenne alors que ceux contenant l'extrait fermenté ne s'est contaminé qu'au bout de 10 jours. En plus de diminuer l'apparition des moisissures, les extraits fermentés ont freiné leur croissance. Ainsi, lorsque l'extrait Champlain fut utilisé, au bout de 10 jours, les pains étaient complètement recouverts de moisissures alors que le diamètre moyen des colonies de moisissures se situait autour de 2 cm au bout de 14 jours pour les pains contenant le même extrait fermenté.

Tableau 3. Effet antifongique des extraits sur les pains

Extrait utilisé dans les pâtes à pain	Jours sans moisissure
Oxoid	8.5
Oxoid fermenté	10.0
Lallemand	6.8
Lallemand fermenté	9.0
Champlain	5.5
Champlain fermenté	9.0
Témoin sans extrait	8.5
Sans extrait avec acide propionique	$\geq 16.0$

Cependant, par rapport au témoin, l'addition des extraits fermentés ou non n'a pas augmenté ni

diminué la période de conservation des pains. Des différences significatives ont été trouvées entre les traitements et le témoin propionique qui tel que mentionné plus haut dépassait de 300 ppm la norme permise en acide propionique.

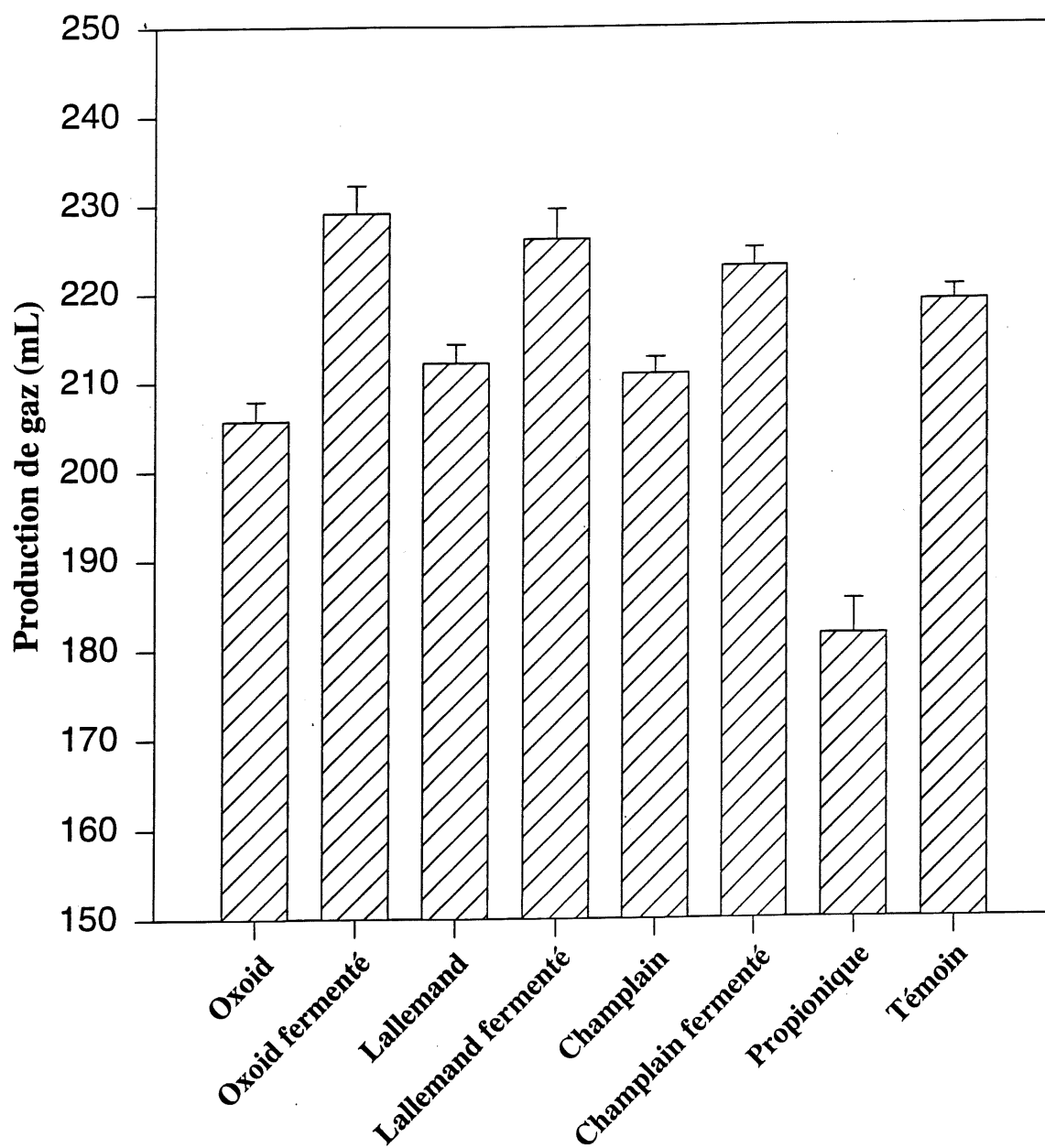
### **3.2 Effet biostimulant en panification**

#### **3.2.1-Sur le métabolisme de la levure de boulangerie**

Pour vérifier l'effet de l'ajout des extraits dans les pâtes à pain, des pâtes non cuites ont été placées dans des conditions simulant la fermentation panaire et la production de gaz fut suivie sur 90 min. par l'appareil Rhizograph. Les essais dans les pâtes à pain ont montré des effets intéressants de la fermentation des extraits sur la stimulation de la fermentation panaire. Pour tous les extraits dans le Rhisograph, il y a eu significativement plus de gaz produit par la levure lorsque l'extrait ajouté était fermenté comparé au non fermenté ( $P < 0.05$ ). Par rapport aux témoins qui ne contenaient pas d'extrait de levure, il n'y a pas eu de différence significative dans la production de gaz lorsque les extraits, fermentés ou pas, furent utilisés dans la recette sauf pour l'extrait Oxoid qui a diminué de façon significative le métabolisme de la levure (figure 5). Des observations similaires ont été obtenues avec la surface moyenne des trous dans les pâtes à pain cuites.

Le fait de fermenter un extrait semble augmenter le pouvoir de stimulation du métabolisme de la levure étant donné que tous les extraits fermentés ont augmenté de façon significative la production de gaz dans les pâtes à pain par rapport aux extraits non fermentés. Le fait donc d'ajouter un extrait de levure dans les pâtes à pain ne représente pas d'avantage ni de désavantage pour la fermentation panaire.





**Figure 5. Effet de l'ajout des extraits de levure sur la production de gaz dans les pâtes à pain**

L'ajout d'acide propionique dans les pâtes à pain a inhibé la fermentation paninaire car environ 20% de moins de gaz a été produit comparativement au témoin. Les pains fabriqués avec l'ajout d'acide propionique ont été défavorisés de façon significative pour la production de gaz par rapport à tous les autres traitements à l'étude. Dans ce cas-ci, la concentration d'acide propionique n'a pas été évaluée par HPLC dans les pâtes fraîches mais il est probable qu'encore cette concentration dépasse celle permise par la loi des aliments et drogues. Ainsi, une telle concentration (environ 2300 ppm) serait inhibitrice du métabolisme de la levure. La nature de l'extrait semble peu importer pour le métabolisme de la levure étant donné qu'il n'y a pas eu de différence significative entre la production de gaz avec tous les extraits fermentés ou non, c'est-à-dire que les extraits non fermentés de Lallemand, Champlain et Oxoid ont contribué à une production de gaz se situant autour de 208 mL alors que les extraits fermentés ont produit environ 225 mL de gaz peu importe la nature de l'extrait.

### 3.2.2-Sur la croissance de la levure- concentration de l'extrait

Avec l'extrait Oxoid, à 1.5 g/l, la densité optimale se situait autour de 1.3 alors qu'à la même concentration, l'extrait Champlain ne montait qu'à 1.1 de densité (figure 6). Dans tous les cas, l'extrait a favorisé la croissance de *Saccharomyces* dans le milieu minimal par rapport au témoin. Etant donné que le milieu Champlain montre une bonne différence entre les concentrations de 1.0 et 1.5 g/l d'extrait et que les rendements maximaux ne sont pas atteints avec cet extrait, des concentrations de 1.5 g/l ont été utilisées pour tous les extraits étudiés (fermentés ou non). Dans le cas des extraits non fermentés Oxoid et Lallemand, peu de différence a été observée entre ces deux concentrations. Pour l'extrait Oxoid cependant, la levure a poussé plus rapidement à 1.5 g/l qu'à plus basse concentration.

Croissance (D.O.)

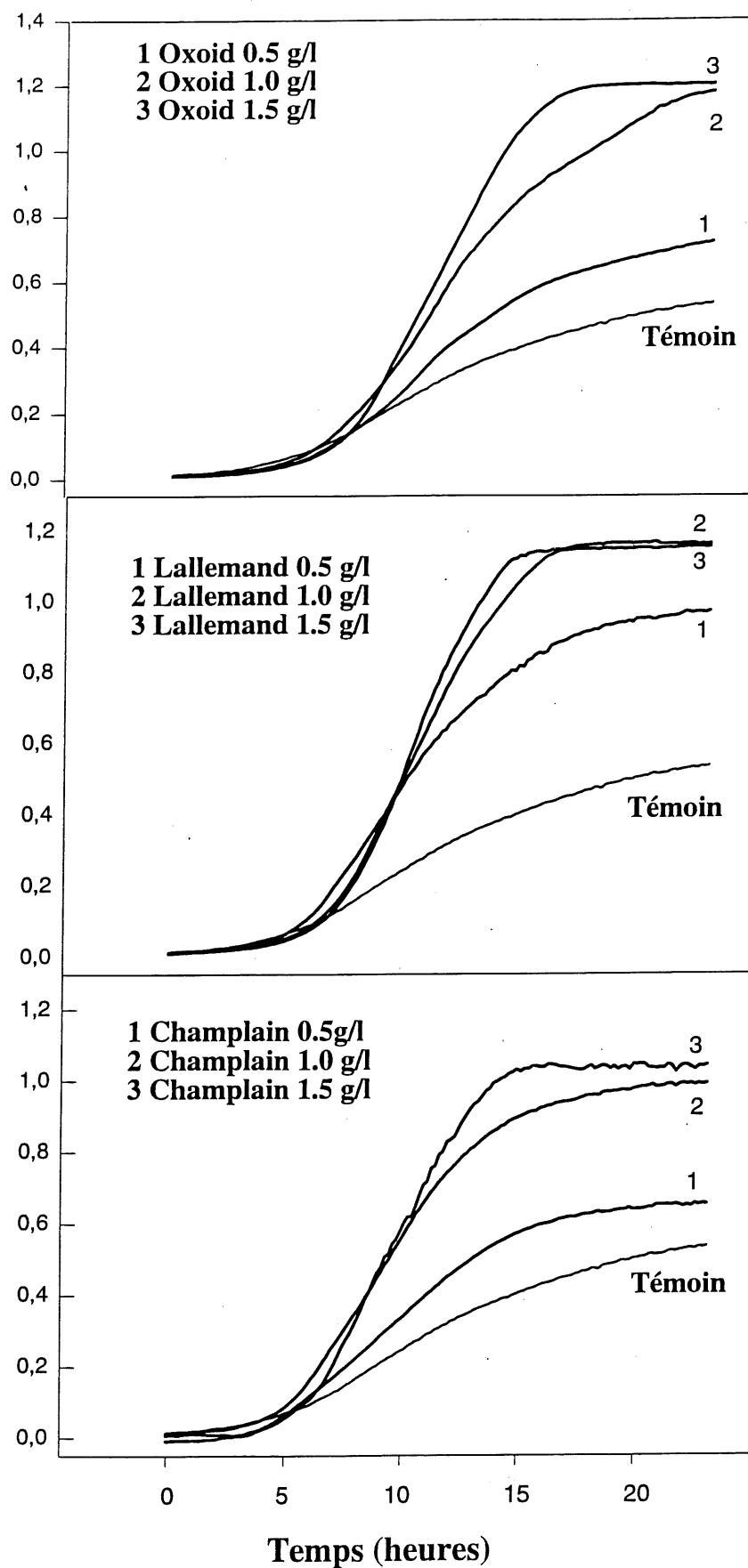


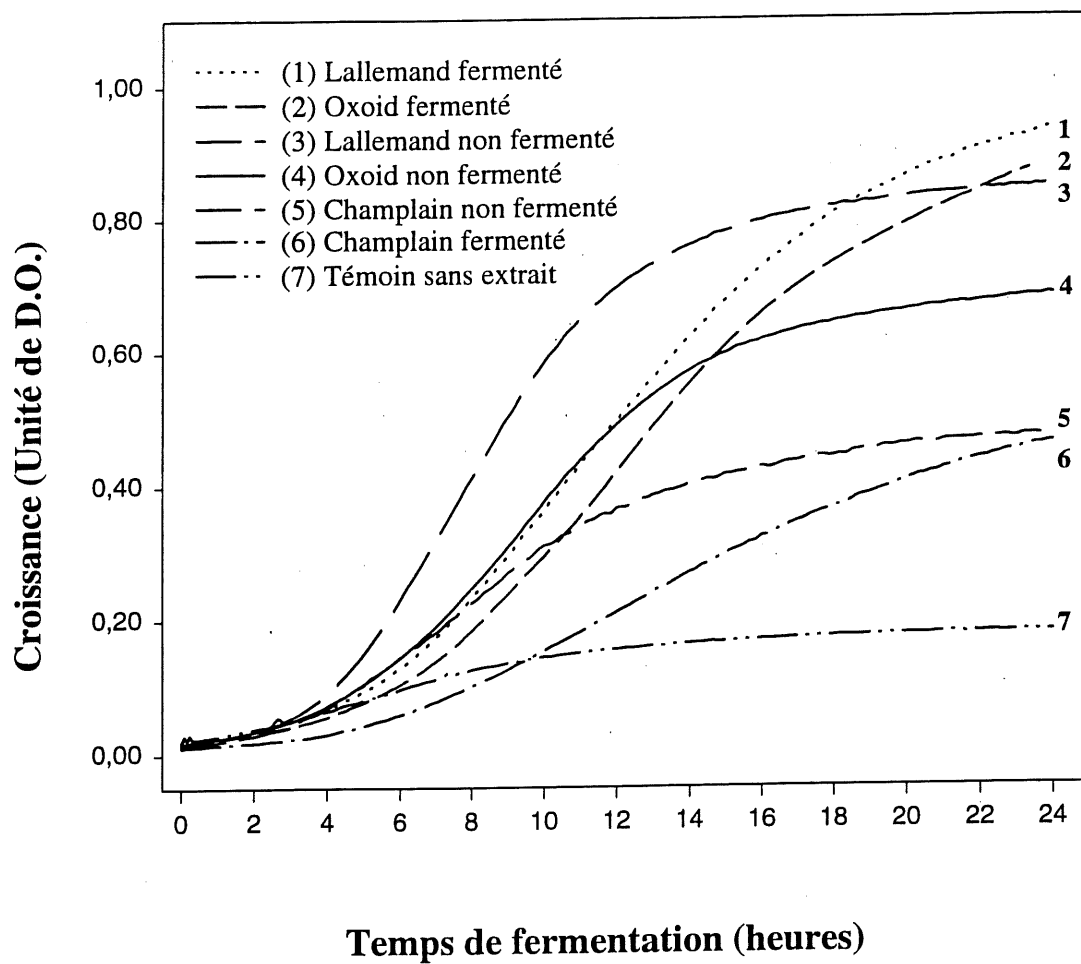
Figure 6.Effet de la concentration d'extraits de levure sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*

### 3.2.3-Discrimination entre les extraits

Pour obtenir les courbes de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*, le milieu non ensemencé fut soustrait de la courbe de croissance. Un milieu non ensemencé fut donc produit pour chaque formulation ainsi qu'un milieu ensemencé ne contenant pas d'extrait de levure (témoin sans extrait). La figure 7 démontre que le milieu minimal était formulé de façon à discriminer entre les extraits. Le milieu sans extrait a donné de piètres biomasses pour *Saccharomyces* (0.20 unité de densité optique). L'extrait ayant le moins bien performé au niveau de la croissance est l'extrait Champlain ayant donné des densités optiques inférieures à 0.5, ce qui est nettement inférieur à celles obtenues lors des essais préliminaires avec les extraits non fermentés (figure 6). Cependant la même chose est vraie avec les autres extraits. Il s'agit plus d'une comparaison relative entre les extraits qu'entre les valeurs obtenues d'un essai à l'autre. L'état physiologique du microorganisme en cause soit *Saccharomyces cerevisiae* était probablement un facteur déterminant de la D.O. maximale atteinte dans chaque cas. Il est intéressant d'observer que la fermentation des extraits a encouragé la biomasse finale de la levure pour les extraits provenant de levure de boulangerie (Oxoid et Lallemand). Les extraits qui ont donné les biomasses les plus importantes sont l'extrait Lallemand fermenté et l'extrait Oxoid fermenté (figure 7). Dans le cas de l'extrait Champlain, la fermentation de l'extrait semble avoir nui à la croissance de la levure car la densité maximale et le taux de croissance obtenus avec l'extrait fermenté sont plus bas qu'avec le non fermenté. Le fait d'utiliser un extrait fermenté même s'il encourageait une biomasse plus importante, semblait diminuer les taux de croissance ( $\mu$ ) et ce pour les 3 extraits utilisés (tableau 4).

Tableau 4. Effet des extraits sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.

Croissance	Extraits non fermentés			Extraits fermentés		
	Oxoid	Lallemand	Champlain	Oxoid	Lallemand	Champlain
D.O. (max)	0.68	0.84	0.47	0.87	0.93	0.46
taux ( $\mu$ )	0.32	0.37	0.29	0.28	0.28	0.25



**Figure 7. Effet de la fermentation des extraits de levure sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.**

## 4 CONCLUSION

Il a été démontré que l'ajout d'extrait de levure influence peu les qualités visuelles du pain. Ainsi la quantité et la grosseur des trous de la mie, le volume final des pains et la production de gaz par la levure n'ont pas été influencés par l'ajout des extraits de levure fermentés ou non dans les recettes par rapport aux témoins; ce qui en soi représente un avantage pour l'industrie de la boulangerie qui n'aurait pas à modifier ses recettes pour camoufler des effets indésirables apportés par l'ajout d'extraits de levure.

Cependant des différences significatives ont été trouvées entre les extraits fermentés et les non fermentés par rapport à la production de gaz. Les essais effectués avec le Rhisograph montrent des différences plus marquées entre les traitements que ceux effectués dans les pâtes à pain cuites. La production de gaz par la levure demeure supérieure lorsque les extraits sont fermentés par rapport aux non fermentés. Cependant, la production de gaz obtenue avec le Rhizograph n'est pas significativement associée au volume des pains cuits. Le pH des pâtes à pain n'ont pas été évalués selon les traitements mais il est reconnu que le pH doit se maintenir entre 4.5 et 5.5 pour favoriser l'activité de la levure (Reed, 1972). L'ajout des extraits dans la recette a pu augmenter son pH initial et défavoriser certaines réactions enzymatiques de la levure. Le fait d'utiliser des extraits fermentés, donc riches en acides organiques, a possiblement rétabli de bonnes conditions de fermentation pour la levure en panification. Dans les recettes américaines, du lait écrémé en poudre est ajouté pour augmenter la production de gaz. On attribue cet effet au pouvoir tampon de cet ingrédient (Lai, 1984) ce qui traduit l'importance du pH en panification.

Dans la préparation de ferment pour pâte à pain, il a été démontré que l'addition d'extrait de levure dans le milieu favorisait la production de gaz sans toutefois influencer le nombre final de cellules, la grosseur des cellules ou le nombre de cellules bourgeonnantes (Lee et Geddes, 1959). La nature des sucres fermentescibles en présence de l'extrait de levure influence de façon importante la production de gaz. Un mélange de glucose/maltose (1/9) a amélioré la production de gaz d'environ 25%. Utilisé seul, le maltose commande un long délai d'induction qui est contrecarré par l'ajout d'une quantité plus

faible de glucose ou de sucrose (Lee et Geddes, 1959).

Pour fermenter et croître la levure a besoin d'azote, de phosphate pour la transformation et l'activation des substrats, ainsi que d'autres ions inorganiques comme le magnésium, cofacteur de toutes les kinases, et de certaines vitamines (Reed, 1972). La plupart de ces nutriments sont contenus dans la farine. Dans la pâte, le principal facteur limitant est l'azote. Généralement, des mélanges d'acides aminés et de sels d'ammonium sont ajoutés. L'ajout d'une source azotée inorganique diminue le temps de montée de façon significative mais non la quantité de gaz produit. D'autre part, lorsqu'un concentré protéique de levure (CPL) de boulangerie fut ajouté à une pâte à pain, une augmentation de 20 à 25% de gaz fut obtenue (Lai *et al.*, 1984) ce qui n'a pas été le cas avec les extraits de levure de l'étude présente. Une série d'expérimentations a démontré que l'effet n'était pas dû à la présence d'un ion métallique, d'une enzyme, d'une vitamine, de l'azote ou d'un sucre fermentescible pouvant être contenu dans le concentré. Etant donné que l'hydrolyse alcaline du CPL détruit son activité, il est proposé qu'une portion peptidique spécifique serait responsable de son pouvoir biostimulant. Chez *Lactobacillus*, un facteur de croissance fut isolé d'un extrait de levure (Higashi *et al.*, 1979) et reconnu comme étant 2 peptides contenant de l'acide glutamique. Pour *Saccharomyces*, la possibilité que 2 systèmes interagissant sur la biostimulation fut soumise; l'un des systèmes étant d'origine protéique et l'autre une entité de faible poids moléculaire (Lai *et al.*, 1984).

Contrairement aux aldolases de la classe I trouvées dans les cellules d'animaux et des plantes, les aldolases des levures (classe II) sont dépendantes des ions  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Mg^{++}$  pour être actives (Ling et Hoseney, 1977). Lors de la fermentation des extraits de levure par *Propionibacterium*, l'acide propionique fut transformé en sel de sodium, ce sodium ayant peut-être favorisé l'activité de la levure. Cependant il est peu probable que le sodium (ajouté comme sel dans la recette de base) soit limitant pour la levure.

On sait également que la biotine est essentielle à la croissance des levures. Les propionibactéries utilisent la biotine comme accepteur de  $CO_2$  lors de la décarboxylation de l'acide succinique, rendant possiblement la biotine plus accessible à la levure lorsqu'utilisée dans le milieu de croissance. Pour

vérifier si cette hypothèse est adéquate, il faudrait simplement compléter le milieu de panification avec de la biotine et observer s'il y a augmentation de la production de gaz.

Des différences plus marquées entre les extraits de levure ont été observées lors de la croissance de la levure en Bioscreen. Ainsi, 2 fois plus de croissance fut obtenue avec l'extrait fermenté de Lallemend qu'avec l'extrait fermenté de Champlain. La croissance est donc plus affectée par le choix de l'extrait que l'activité de la levure. En plus, pour l'extrait Champlain, la fermentation de l'extrait n'a pas entraîné d'augmentation de biomasse finale et a même ralenti la croissance par rapport à l'extrait non fermenté (figure 7) alors que les essais sur l'activité ont révélé le contraire. Ce fut le cas unique de l'extrait Champlain qui rappelons-le provient d'une levure de brasserie.

Il a été démontré que lorsque plus de 2000 ppm d'acide propionique furent utilisés dans les recettes de pain, ceux-ci se conservaient jusqu'à 2 fois plus longtemps que les témoins. La fermentation des extraits a augmenté la durée de conservation des pains dans tous les cas, pour tous les extraits mais d'une façon moins prononcée qu'avec l'acide propionique seul. Ceci s'explique par le fait que la concentration d'acide propionique utilisée dans les témoins était supérieure à celle retrouvée dans les poudres d'extrait de levure. Le fait que les poudres contenaient en plus de l'acide acétique n'était pas suffisant pour palier à cette différence. Le pH des produits de boulangerie influencera directement l'efficacité de l'acide propionique. Ainsi dans des tortillas à farine de blé, la durée de conservation de la pâte diminuera de moitié si le pH passe de 5.6 à 6.0 (Friend *et al.*, 1995). Les qualités de la pâte seront cependant affectées par des pH trop acides, possiblement dû à une agglomération des protéines rendant la pâte peu malléable.



## Chapitre IV

### CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail était de produire un extrait de levure riche en acide propionique pouvant être utilisé en panification comme agent antifongique et stimulant de la croissance de la levure. Le défi était de le produire par fermentation avec une souche poussant relativement lentement sur un milieu offrant la difficulté majeure d'être très concentré en extrait de levure (7%). Le rêve était de développer un procédé simple et efficace applicable à l'industrie alimentaire tout en étant d'avant garde.

La technique des cellules immobilisées a prouvé son utilité pour court-circuiter les longues périodes de latence de *Propionibacterium* et des rendements élevés en acide propionique ont été obtenus en moins de 48 heures. De plus, la biomasse a pu être recyclée au moins 3 fois en supplémentant le milieu avec du calcium (0.5%) pour éviter la dépolymérisation des billes. Le calcium se retrouvant dans la composition finale de l'extrait fermenté présente l'avantage possible d'augmenter l'apport quotidien de calcium si celui-ci est ajouté à un aliment préparé.

La recette du milieu riche en extrait de levure a été développée en utilisant le lactate (2%) comme substrat principal, additionné d'un minimum de glucose (1%) pour éviter l'acidification en cours de fermentation tout en maintenant une bonne production d'acides propionique et acétique. Malgré cela, peu de croissance bactérienne a été observée dans les billes. Cependant, une croissance des cellules

relarguées dans le milieu a été notée, démontrant que le milieu offre de bonnes conditions de croissance. Des études récentes démontrent que lorsque les cellules encapsulées sont placées dans des flacons incubés en conditions anaérobies, il y a augmentation de la biomasse de 2 unités log en 48 heures. Des populations démarrant à  $1 \times 10^8$  cfu/g de bille ont atteint une biomasse finale de  $1 \times 10^{10}$  cfu/g. Les effets du réacteur et des conditions d'incubation sont encore à l'étude. Il a cependant été démontré que la nature de l'alginate n'influençait pas la biomasse finale (résultats non publiés). Lors de la première fermentation, une transformation incomplète du glucose a été obtenue. Cependant lors des fermentations suivantes, tous les substrats ont été métabolisés par la souche.

Malgré un nombre impressionnant de publications portant sur l'utilisation des cellules immobilisées, peu d'applications industrielles sont reconnues. Citons entre autres la production d'acide aspartique utilisant des cellules mortes d'*Escherichia coli* (Japon, depuis 1973), la production d'acide malique avec des cellules mortes de *Brevibacterium* (Japon, depuis 1974) et la production de prednisolone utilisant *Corynebacterium* (Suède depuis 1978) (Kennedy et Cabral, 1983). Des industries du domaine alimentaire utilisent possiblement la technologie des cellules immobilisées s'assurant de bien en garder le secret, cependant son utilisation demeure limitée dû à des facteurs économiques, à la complexité de l'équipement nécessaire pour une opération en continu sans mentionner les problèmes de mise à l'échelle pour la fabrication des billes avec des cellules vivantes. D'où le besoin de développer des procédés et des matrices permettant une utilisation facile et peu coûteuse ayant une bonne interaction avec le substrat.

Trois extraits de levure ont été utilisés et aucune différence significative n'a été observée quant aux rendements en acides propionique ou acétique obtenus. Les rendements augmentent avec le recyclage des cellules traduisant soit une adaptation des cellules au milieu ou une accumulation des métabolites produits dans les billes. Les milieux de fermentation une fois leur biomasse retirée furent séchés par atomisation sans perte majeure des acides organiques d'intérêt. Cette première étape de production d'un extrait de levure riche en acide propionique ne semble donc pas présentée de difficulté majeure quant à son application à l'échelle industrielle. Il serait pertinent d'utiliser comme source de lactate du lactosérum, sous-produit de l'industrie fromagère. L'addition de lactosérum dans les denrées

destinées à l'alimentation humaine comme les céréales en augmente la valeur nutritive. Les extraits riches en acide propionique ont été utilisés avec succès dans les recettes de pain. L'effet antifongique même si moins prononcé qu'espéré fut significatif par rapport aux pains fabriqués avec des extraits non fermentés. Les extraits riches en acide propionique ont prolongé la stabilité microbienne du produit sans toutefois affecter ses caractères. Les valeurs pH des pâtes à pain auraient dû être enregistrées et même contrôlées pour établir une comparaison uniforme des extraits fermentés.

L'effet antifongique de l'extrait pourrait possiblement être accentué en variant la formulation des pâtes. L'acidification de la pâte avec de l'acide acétique aurait le double avantage d'agir en synergie avec l'acide propionique. L'utilisation de jus de fruits comme le jus de pruneaux ou de raisins est reconnue pour diminuer le développement des moisissures dans les produits de boulangerie possiblement dû à son haut contenu en acide malique et à la présence d'acide benzoïque (Sanders, 1991).

En plus de connaître le pouvoir antifongique des extraits, il serait à propos d'étudier le pouvoir de conservation des extraits fermentés sur *Bacillus*, principal responsable des problèmes d'altération dans les mies de pains bruns. La présence de *Bacillus subtilis* dans les pains est même associée à certaines maladies d'origine alimentaire, d'où le besoin de mieux contrôler la contamination et la croissance de ces microorganismes.

Le fait de fermenter les extraits a amélioré les fermentations panaires en augmentant la production de gaz produit par la levure. Il serait certes à propos d'étudier d'autres extraits de levure dans l'espoir d'améliorer davantage le procédé de panification. L'ajout des extraits qu'ils soient fermentés ou non peut augmenter la saveur du pain et la couleur de la croûte. Des pains à saveur de fromage pourraient également être produits grâce à la présence de l'acide propionique dans l'extrait et à une recette accentuant la saveur.

L'utilisation de *Propionibacterium* en association avec des levures sélectionnées de *Kluyveromyces* dans un milieu de lactosérum a été proposée dans le but de produire une biomasse riche en protéines

et en vitamines. Les propionibactéries sont de bons producteurs de vitamines B<sub>12</sub> mais leur faible croissance limite les applications industrielles. La technique des cellules immobilisées et l'utilisation des levures offrent des alternatives intéressantes pour le procédé. Il a été démontré que l'association *Propionibacterium*-levure se compare favorablement aux protéines cellulaires (single cell protein) en terme de valeur nutritive et de rendements (Skupin *et al.*, 1978). De plus, les biomasses obtenues étaient plus riches en méthionine que plusieurs SCP connues. Le mélange pourrait même être séché et utilisé en boulangerie comme supplément vitaminé, source de protéines d'acides aminés et de calcium. Et avantage non négligeable, la technologie contribuerait à recycler un déchet de l'industrie alimentaire.

Javanainen (1993) a proposé d'inclure *Propionibacterium* dans le ferment lactique pour des pains de type acidifié (sour dough). Des concentrations en acide propionique variant de 0.42 à 1.04% (p/v) ont été obtenues. Cependant, ce procédé ne s'applique que dans ce type de pain particulier et peut facilement être compromis par un déséquilibre des souches lactique et propionique.

Les tendances internationales vers l'élimination des agents de conservation chimiques pairées à un coût de production peu élevé favorisent le développement de procédés de fermentation, dans lesquels les biomasses sont recyclables, les déchets générés sont minimaux et ajoutent de la valeur à un produit existant. Donc pour rendre le procédé encore plus alléchant pour l'industrie alimentaire il faut augmenter les rendements d'acide propionique et ceci pourrait être réalisé en utilisant des procédés de fermentation en "fedbatch". L'utilisation d'un milieu riche en extrait de levure additionné de lactosérum comme source de lactate diminuerait le coût de production et augmenterait la concentration de calcium. Plusieurs utilisations sont envisageables pour une poudre riche en vitamines, minéraux, acides organiques et qui plus est, est toute naturelle!

## RÉFÉRENCES

- Adams, M.R. et Hall, C.J. 1988. Growth inhibition of foodborne pathogens by lactic and acetic and their mixtures. *Int. J. Food Science Technol.* 23: 287-292.
- Barbotin, J.N., Nava Saucedo, J.E. et Thomasset, B. 1990. Morphological observations on immobilized cells. In: *Physiology of immobilized cells* (De Bont, J.A.M. Visser, J., Mattiason, J. et Tamper, J., Eds.) pp. 487-498. Elsevier Science, Amsterdam.
- Bégin, A., Beaulieu, Y., Goulet, J. et Castaigne, F. 1992. Whey fermentation by *Propionibacterium shermanii* immobilized in different gels. *Milchwissen.* 47: 411-415.
- Berger, J.M., Johnson, M.J., Peterson, W.H. 1938. The proteolytic enzymes of bacteria. . II The peptidases of some common bacteria. *J. Bacteriol.* 36:521-545.
- Bibek, R., Daeschel, M., 1985. Food biopreservatives of microbial origin: In *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3 (Eds. H. W. Blanch, S. Dew, D.I.C. Wang) Pergamon Press, New-York. 1985.
- Boyaval, P. et Corre, C. 1987. Continuous fermentation of sweet whey permeate for propionic acid production in a CSTR with UF recycle. *Biotech. Lett.* 9: 801-806.
- Cachon, R. 1993. Etude du comportement cinétique d'une bactérie lactique modèle en culture libre ou immobilisée dans des billes de gel. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne, Dijon, France.
- Cavin, J.F., Saint, C. et Diviès, C. 1985. Continuous production of emmental cheese flavors and propionic acid starters by immobilized cells of propionic acid bacterium. *Biotechnol. Lett.* 7: 821-826.
- Champagne, C.P. 1998. Physiologie appliquée des bactéries lactiques. Dans: *Production de ferments*

*lactiques dans l'industrie laitière*. Édisem/Fondation des Gouverneurs, St-Hyacinthe, pp11-64.

Champagne, C.P., Baillargeon-Côté, C. Et Goulet, J. 1989. Whey fermentation by immobilized cells of *Propionibacterium shermanii*. J. Appli. Bacteriol. 66: 175-184.

Champagne, C.P., Girard, F. et Gardner, N. 1989. Growth of yeast contaminants in an immobilized lactic acid bacteria system. Biotechnol. Lett. 10: 463-468.

Champagne, C.P., Girard, F. et Morin, N. 1988. Bacteriophage development in an immobilized lactic acid bacteria system. Biotechnol. Lett. 10: 463-468.

Champagne, C.P. et Goulet, J. 1984. Microbiologie du lait, chap.3. Science et technologie du lait. FIL, Presse de l'Université Laval.

Champagne, C.P., Lange, M., Blais, A. et Goulet, J. 1992. Caractéristiques et emploi de cultures lactiques en industrie laitière. Conseil des denrées alimentaires du Québec. 70 p.

Champagne, C.P., Lacroix, C. et Sodini-Gallot, I. 1994. Immobilized cell technology for the dairy industry. Critical Reviews in Biotechnology, 14(2):109-134.

Cheetam, P.S.J., Blunt, K.W. et Bucke, C. 1979. Biotechnol. Bioeng. 21:2155-2168.

Colombian, A., Roger, P. et Boyaval, P. 1993. Production of propionic acid from whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration and cell recycling. Biotech. Bioeng.. 42:1091-1098.

Cooper, T.G., Tchen, T.T., Wood, H.G. et Benedict, C.R. 1968. The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate. J. Biol. Chem. 243:3857-3863.

Crow, V. 1986. Utilization of lactate isomers by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*:

Regulatory role for intracellular pyruvate. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(2):352-358.

Divies, C., Prevost, H. et Cavin, J.F. 1989. Les bactéries immobilisées dans l'industrie laitière. *Process N°1041*. pp.29-33.

Diviès, C., Cachon, R., Cavin, J.F., Prévost, H. 1994. Immobilized cell technology in wine production. *Critical Rev. Biotech.* 14(2):135-153.

Dixon, M. et Webb, E.C. 1979. *Enzymes*, 3 rd edition Longman, GP Limited, p.886.

Doyon, G., Gaudreau, G., St-Gelais, D., Beaulieu, Y. et Randail, C.J. 1991. Simultaneous HPLC determination of organic acids, sugars and alcohols. *Can. Inst. Sci. Tech. J.* 24(1/2):87-94.

El-Hagarawy, I.S. , Slatter, W.L., Harper, W.J. et Gould, A. 1954. Factors affecting the organic acid production of propionibacteria used in manufacture of Swiss cheese. *J. Dairy Sci.* 37:638.

Field, M.F. et Lichstein, H.C. 1958. Growth stimulating effect of autoclaved glucose media and its relationship to the carbon dioxide requirement of propionibacteria. *J. Bacteriol.* 76:485-490.

Field, M.F. et Lichstein, H.C. 1957. Factors affecting the growth of propionibacteria. *J. Bacteriol.* 73:96-99.

Flores-Galarza, R.A., Glatz, B.A., Bern C.J. et Van Fossen, L.D. 1985. Preservation of high moisture corn by microbial fermentation. *J.Food Prot.* 48:407-411.

Freudenreich, E. Von and Jensen, O. 1906. Über die im Emmentalerkase stattfindende Propionsäuregärung. *Zentralblatt für bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 17: 529-546.

Friend, C.P., Ross, R.G., Waniska, R.D. et Rooney, L.W. 1995. Effects of additives in wheat flour tortillas. *Cereal Foods World*. 40 (7):494-497.

Furia, E.T. 1968. Handbook of food additives, publié par Rubber Company.

Gaudreau, H., Champagne, C.P., Goulet, J., et Conway, J. 1997. Lactic fermentation of media containing high concentrations of yeast extracts. *J. Food Sci.* 62:1072-1075.

Gauthier, M., Rouault, A., Sommer, P. et Briandet, R. 1995. Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in Swiss cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2572-2576.

Gélinas, P., Lachance, O., et Vachon, M. Preparation of fermented milk ingredients to increase flavour and bread aroma. *Abstract of the Poster Session*, 9th Int. Cereal and Bread Congr., Paris, June 1-5. 1992. P.30.

Hervé, M., Efstathiou, T., Quiblier, J.P. et Méjean, S. 1992. Un conservateur naturel pour les fromages à pâte pressés. *Process* #1069:24-29.

Hettinga, D.H. et Reinbold, G.W. 1972. The propionic-acid bacteria- a review. *Growth. J. Food Technol.* 35: 295-301.

Hettinga, D.H. et G.W. Reinbold. 1972. The propionic-acid bacteria- a review. II. Metabolism. *J. Food Technol.* 35:358-372.

Higashi, K., Takeda, M., et Tsukahara, T. 1979. Nutritional requirement of hiochi-bacteria in high ethanol concentration. VII. Separation of peptides from yeast extract. *J. Soc. Jpn. Brewing. (Nihon Jozo Kyokai Zasshi)*. 74:555. *Chem. Abstr.* 91:171372f.

Holly, A. Von. 1994. Rope spoilage of bread. *Food Industries of Africa*. 47: 13-15.



Hsu, S.T. et Yang, S.T. 1991. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: effects of pH. Biotech. Bioeng. 38:571-578.

Hutkins, R.W. et Nannen, N.L. 1993. pH homeostasis in lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 76: 2354-2365.

Jain, D.K., Tyagi, R.D., Kluepfel, D. et Agbebavi, T.J. 1991. Production of propionic acid from whey ultrafiltrate by immobilized cells of *Propionibacterium shermanii* in batch process. Process Biochemistry. 26:217-223.

Kennedy, J.F. et Cabral, J.M.S. 1983. Immobilized living cells and their applications. Appl. Biochem. Bioeng. 4:189-280.

Klein, J., Stock, J. et Vorlop, K.D. 1983. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18:86-91.

Kouassi, Y. et Shelef, L.A. 1996. Metabolic activities of *Lysteria monocytogenes* in the presence of sodium propionate, acetate, lactate and citrate. J. Applied Bacteriol. 81:147-153.

Krebs, H.A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A. et Bedoya, F. 1983. Studies on the mechanism of the antifungal action on benzoate. Biochemi. J. 214:657-663.

Lai, C.S., Davis, A.B. et Hoseney, R.C. 1984. Isolation of a fermentation stimulant from yeast protein concentrate. Cereal Chem. 61(5):428-431.

Lee, J.W. et Geddes, W.F. 1959. Studies on the brew process of bread manufacture: the effect of sugar and other nutrients on baking quality and yeast properties. Cereal Chem. 36 (1):1-18.

Lewis, V.P. et Yang, S-T. 1992. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*:

effect of growth substrate. Microbiol. Biotechnol. 37: 437-442.

Lewis, V.P. et Yang, S.T. 1992. Continuous propionic acid fermentation by immobilized *Propionibacterium acidipropionici* in a novel packed-bed bioreactor. Biotech. Bioeng. 40:465-474.

Ling, R.S. et Hoseney, R.C. 1977. Effect of certain nutrients on the gas produced in preferments. Cereal Chem. 54(3):597-604.

Mantere-Alhonen, S. 1995. Propionibacteria used as probiotics-A review. Lait.75: 447-452.

Mantere-Alhonen, S. 1982. Propionic acid bacteria from the dairy industry as intestinal microorganisms. In *Dairy Science Abstracts* 44, Abstract #6900, 1982.

Marcoux, V. , Beaulieu, Y., Champagne, C.P. et Goulet, J. 1992. Production of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* in whey-based media. J. Ferment. Bioeng. 74: 95-99

Moat, A.G. et Delwiche, E.A. 1950. Utilization of coenzyme A by *Propionibacterium freudenreichii*. J.Bacteriol. 60: 757-762

Mulder, M. W. A. W., Hultst, M.C., van der, Bolder, M.N. 1987. *Salmonella* decontamination of broiler carcasses with lactic acid, L-cysteine and hydrogen peroxyde. Poultry Sci. 66(9):1555-1557.

Neronova, N. M., Ibragimova, S.I. et Ierusalimskii, N.D. 1967. Effect of propionate concentration on the specific growth rate of *Propionibacterium shermanii*. Mikrobiologika. 36:404-409

Northrop, D.B. et Wood, H.G. 1969. Transcarboxylase: V. The presence of bound zinc and cobalt. J. Biol. Chem. 244:5801-5807.

Paik, H.D. et Glatz, B.A. 1994. Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant

strain of *Propionibacterium acidipropionici*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:22-27.

Peppler, H.J. 1982. Yeast extracts, In Fermented Foods, A.H. Rose ed., Academic Press, London, pp. 511-516.

Playne, M.J.: In Comprehensive Biotechnology, Vol. 3 (Eds.H.W. Blanch, S.Dew, D.I.C. Wang) Pergamon Press, New-York 1985.

Prévost, H. et Diviès, C. 1987. Fresh fermented cheese production with continuous pre-fermented milk by a mixed culture of mesophilic lactic streptococci entrapped in Ca-alginate. Biotechn. Lett. 9:789-794.

Prévost, H. et Diviès, C. 1988. Continuous pre-fermentation of milk by entrapped yoghurt bacteria II. Data for optimization of the process. Milchwiss.(11):716-719.

Prévost, H., Diviès, C. et Rousseau, E. 1985. Continuous yoghurt production with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* entrapped in Ca-alginate. Biotechn. Lett. 7:247-252.

Quastel, J.H. et Webley, D.M. 1942. Vitamin B<sub>1</sub> and bacterial oxydation. The effects of magnesium, potassium and hexosediphosphate ions. Biochem. J. 36:8-33.

Quesada-Chanot, A., Afschar, A.S. et Wagner, F. 1994. Optimisation of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42:16-21.

Reed, G. 1972. Yeast Food. Bakers Digest. 46(6):16-18.

Reinbold, G.W. 1938. The propionibacteria:milk product. Bacterial Starters cultures for foods:76-84.

Rooij, J.F.M. et Hakkaart, M.J.J. 1986. Patent no GP 2171 585 A.

Rosner, B. et Schink, B. 1990. Propionate acts as carboxylic group acceptor in aspartate fermentation by *Propionibacterium freudenreichii*. Arch. Microbiol. 155:46-51.

Roy, D., Leduy, A. et Goulet, J. 1987. Continuous production of lactic acid from whey permeate by free and calcium alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*. J. Dairy Sci. 70:506-513.

Ryan, E.M. et Ward, O.P. 1985. Study of the effect of  $\beta$ -1,3 glucanase from *Basidiomycete* QM 8060N on yeast extract production, Biotech. Lett. 7(6):409-412.

Sanders, S.W. 1991. Using prune juice concentrate in whole wheat bread and other bakery products. Cereal Food World. 280-283.

Sauer, E.T. Carboxylic acids (Economic aspects) In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Vol. 5 (J.I. Kroschwitz and Howe-Grant eds), 4 th ed., John Wiley & Sons, New-York, 1993, pp. 179-187.

Scott, C.D. 1987. Immobilized cells: a review of recent literature. Enzyme Microbiol. Technol. 9(2):66-73.

Sheng-Tsinug, H. et Shang-Tian, Y. 1991. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: Effects of pH. Biotech. Bioeng. 38:571-578.

Skupin, J., Pedziwilk, F., Gigk, A., Nowakowska, A., Jaszewski, B. et Alford, J.A. 1977. Nutritive value of propionibacteria and lactose fermenting yeast grown in whey. Journal Food Processing Preservation. 1:207-216.

Sneath, P.A., Mair, N.S., Sharpe M.E. et Holt, E.G. eds. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.

Steenenson, L.R., Klaenhammer, T.R. et Swaisgood, H.E. 1987. Calcium alginate-immobilized cultures of lactic streptococci are protected from bacteriophage. J. Dairy Sci. 70:1121-1127

Sugimoto, H. 1974. Synergistic effect of ethanol and sodium chloride on autolysis of Baker's yeast for preparing food grade yeast extracts. J. Food Sci. 39:939-942.

Tatum, E.L. , Fred, E.B. , Wood, H.G. et Peterson, W.H. 1936. Essential growth factors for propionic acid bacteria. J. Bacteriol. 32:157-174.

Tong, C.H. et Drauhon, F.A. 1985. Inhibition by antimicrobial food additives of Ochratoxin A by *Aspergillus sulphurus* and *Penicillium viridicatum*. Appl. Environ. Microbiol. 49(6): 1407-1411.

Vivian, P. et Shang-Tian Yang. 1992. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*: effect of growth substrate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 437-442.

Wood, H.G., Andersen, A.A. et Werkman, C.H. 1938. Nutrition of the propionic acid bacteria. J. Bacteriol. 36:210-214.

Woskow, S.A. et Glatz, B.A. 1991. Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semi-continuous fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 53:823-827.

Yabbanavar, V.M. et Wang, D.I.C. 1991. Analysis of mass transfer for immobilized cells in an extractive lactic acid fermentation. Biotechnol. Bioeng. 38:232.

Youngsmith, B. and P. Apiraktivongse. 1983. Vitamin B<sub>12</sub> production from soybean curd whey with *Propionibacterium freudenreichii*. J. Ferment. Technol. 61:105-107.

Annexe A

Clé d'identification pour les espèces du genre *Propionibacterium*

I Hydrolyse de l'esculine

A. Hydrolyse incomplète de la gélatine

1. Mannitol non acidifié

a. Réduction du nitrate

i. Lactose non acidifié ***P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii***

ii. Lactose acidifié ***P. freudenreichii* ssp. *globosum***

b. Nitrate non réduit

i. Trehalose non acidifié ***P. freudenreichii* ssp. *shermanii***

ii. Trehalose acidifié ***P. theonii***

2. Mannitol acidifié

a. Réduction du nitrate ***P. acidi-propionici***

b. Nitrate non réduit ***P. jensenii***

B. Hydrolyse complète de la gélatine ***P. avidum***

II Esculine non hydrolysée

A. Production d'indole ***P. acnes***

B. Indole non produit

1. Adonitol, erythrotol, maltose et ribose acidifié

***P. lymphophilum***

2. Adonitol, erythrotol, maltose et ribose non acidifié

a. Réduction du nitrate ***P. acnes***

b. Nitrate non réduit ***P. granulosum***

Tiré du Bergey's

## Annexe B

### Calcul du facteur microscopique

Biomasse= moyenne des bactéries par champ X facteur microscopique

Facteur microscopique= Aire de la lame observée (mm<sup>2</sup>) (HXL)

---

Aire du champ microscopique X Volume d'échantillon

Ce qui correspond avec notre microscope à  $1.99 \times 10^4$  comme facteur microscopique à 1000x de grossissement.